

RECEIVED 1611

JUN 14 2001

TECH CENTER 1600/2900

PATENT



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of

Eisenhut et al.

Serial No.: 09/781,980

Filed: 14 February 2001

For: Oligonucleotide Conjugates

Patent Art Unit: TBA

Examiner: TBA

#5 / K.T.
7-13-01
Priority

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Attached hereto is a certified copy of the priority document DE 100 06 572 filed
14 February 2001, as well as a sworn English language translation thereof. Acknowledgement
of the request for priority is requested respectfully.

Respectfully submitted,

Dean H. Nakamura
Attorney for Applicants
Reg. No. 33,981

Roylance, Abrams, Berdo
& Goodman L.L.P.
1300 19th Street, N.W., Suite 600
Washington, D.C. 20036-2680
(202) 659-9076

Dated: 30 April 2001

RECEIVED

JUN 14 2001

TECH CENTER 1600/2900



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

100 06 572.4

Anmeldetag:

14. Februar 2000

Anmelder/Inhaber:

Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts, Heidel-
berg, Neckar/DE

Bezeichnung:

Oligonucleotid-Konjugate

IPC:

C 07 K 7/64

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. März 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Waasmaier

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
"Oligonukleotid-Konjugate"
Unser Zeichen: K 2734 - sch / st

Oligonucleotid-Konjugate

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Oligonucleotid-Konjugat umfassend: (a) ein Oligonukleotid, dessen Sequenz mindestens zu einem Teil einer intrazellulären Nucleinsäuresequenz komplementär ist; und (b) ein Somatostatin-Analoges. Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein dieses Oligonucleotid-Konjugat enthaltendes Arzneimittel, vorzugsweise zur Therapie von Geweben, bei denen der Somatostatin-Rezeptor (SSTR) überexprimiert wird.

In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl von Publikationen veröffentlicht (Chrissey, Antisense Res. Devel. 1 (1991), 65), die sich mit der biologischen Aktivität von synthetischen "Antisense"-Oligonukleotiden (ODNs) befaßten. Die Idee, die sich hinter der medizinischen Anwendung derartiger ODNs verbirgt, ist die intrazelluläre Hybridisierung mit einer entsprechenden "Sense"-Sequenz der messenger RNA, welche für ein bestimmtes Protein codiert. Nach ODN-mRNA Doppelstrangbildung wird RNase H aktiviert, welche die mRNA hydrolytisch zerstört. Andere Mechanismen haben eine Hemmung der Translationsinitiation und des Spleißens von prä-mRNA zur Folge. Diese Mechanismen inhibieren die Expression eines bestimmten Proteins und sind für ein intaktes ODN wiederholbar. Die Effektivität intrazellulärer "Antisense"-ODNs sollte daher groß sein. Neben einer Reihe von vielversprechenden Experimenten, die mit Zellkulturen durchgeführt wurden, gab es jedoch gravierende Rückschritte bei der klinischen Anwendung von "Antisense"-ODNs der ersten Generation. Zu Verbindungen der zweiten Generation gehörten vor allem die Phosphorothioate, die sich von den bis dahin getesteten ODN-Derivaten durch eine bessere in vivo-Stabilität gegenüber Nucleasen und eine erhöhte Zellmembranpermeabilität auszeichneten. Die anderen Modifikationen wurden an den Basen und am oligomeren Rückgrat der ODNs durchgeführt, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Zu den zum Teil gravierenden Nebeneffekten der Phosphorothioate gehörten

starke Immunreaktionen. Die Verbesserungen, die derzeit mit den kommerziell favorisierten Phosphorothioaten erreicht werden sollen, sind einerseits Ladungsverminderung durch Einführen ungeladener Oligobausteine, um unerwünschte Nebeneffekte zu reduzieren und andererseits die Sequenzoptimierung, um die Affinität zur Ziel-mRNA zu verbessern.

Die Aufnahme von Oligonukleotiden in die Zelle erwies sich als zeit-, temperatur-, energie- und konzentrationsabhängig. Physikochemische Charakteristika, die besonders die Pharmakokinetik dieser Verbindungen beeinflussen, sind die Lipophilie, der Ionisierungsgrad und die molekulare Gestalt. Limitierend wirkt sich dabei besonders ihre polyanionische Ladung beim Passieren der positiv geladenen Zellmembran aus. Der Membrantransport und die zelluläre Verteilung variieren stark bei modifizierten Oligonukleotiden als Funktion der veränderten Lipophilie und Ladungsverteilung (Crooke und Lebleu, Antisense Research and Applications (1993), CRC Press, Boca Raton, FL). Unmodifizierte Phosphodiesteroligonukleotide werden durch rezeptorgesteuerte Endozytose in die Zelle internalisiert. Diese 34 bis 90 kDa Rezeptorproteine mit offensichtlich geringer Transportkapazität wurden unter Zuhilfenahme verschiedener Methoden identifiziert (Loke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 3474; Yakubov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 6454). Ihre wirkliche Funktionsweise ist aber noch nicht entschlüsselt. Methylphosphonate dringen durch absorptive Endozytose (Pinozytose) in die Zelle ein. Andere modifizierte Oligonukleotide sind ebenfalls nicht auf eine Diffusion durch die Zellmembran angewiesen und werden durch Endozytose ohne spezielle Rezeptoren eingeschleust. Ob der Inhalt des Endosoms letztendlich im Zytoplasma ohne weiteres freigesetzt wird, ist bisher jedoch noch unklar. Das Problem liegt in dem schwierigen Nachweis der Oligonukleotide in den sehr dicht beieinanderliegenden Zellkompartimenten Vakuolen, Zytoplasma und Zellkern mit den gegenwärtigen Meßmethoden (Milligan et al., J. Med. Chem. 36 (1993), 1923). Manche Autoren berichten, daß nur bis zu 10% der Oligonukleotide aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere gelangen (Edington, Bio/Technology 10

(1992), 993). Mikroinjektionen von natürlichen und modifizierten Oligonukleotiden mit Fluoreszenz-Markierungen zeigten dagegen unter dem Fluoreszenzmikroskop innerhalb von Sekunden eine Konzentrierung der Probe im Zellkern. Die Korrelationen zwischen den Beobachtungen aus der Fluoreszenzmikroskopie und der biologischen Aktivität der Verbindungen verdichteten die These, daß der Transport durch die Zellmembran und die Freisetzung der Oligonukleotide aus den Vakuolen zu den ineffektivsten Schritten in den beschriebenen Transportmechanismen zählen.

Viele Anstrengungen wurden daher unternommen um die Permeation zu verbessern. So haben beispielsweise Phosphorothioate in Gegenwart von kationischen Lipiden eine erhöhte Antisense-Aktivität, in Gegenwart anionischer Lipide dagegen keine (Collige et al., Biochemistry 32 (1993), 7). Phosphorothioate besitzen wegen ihrer erhöhten Lipophilie eine verbesserte Passierbarkeit durch die Zellmembran gegenüber Phosphodiestern. Sie können aber andererseits die oben erwähnten unerwünschten Nebenreaktionen auslösen, die durch bestimmte ODN-Sequenzen und Modifikationen zu massiver Cytokinausschüttung und nachfolgender Immunstimulation führten (Krieg et al., Nature 374 (1995), 546; Stein et al., Gene 72 (1988), 333). In Affen wurden durch Phosphorothioat-Oligodesoxynucleotide Komplement-aktivierung, Thrombenbildung und Bluthochdruck (Galbraith et al., Antisense Res. Dev. 4 (1994), 201) hervorrufen. Außerdem verfügen diese Verbindungen über potentielle Bindungseigenschaften zu Proteinen, wie Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, mit der Folge von zahlreichen Nicht-Antisense-Effekten (Matteucci und Wagner, Nature 384 (1996), 20; Stein und Cheng, Science 261 (1994), 1004; Hertl et al., J. Invest. Derm 104 (1995), 813; Maltese et al., Nucleic Acids Res. 23 (1995), 1146; Chavany et al., Molec. Pharmac. 48 (1995), 738).

Andere Strategien zur Verbesserung der Zellaufnahme verfolgten die Induktion von bekannten Transportmechanismen durch die Kopplung bestimmter Gruppen. Beispiele sind die Konjugation von hydrophoben Gruppen wie Cholesterin, Phospholipiden oder

von ladungskompensierenden Poly(L-Lysin) (PLL)-Ketten (Crooke und Lebleu, Antisense Research and Applications (1993), CRC Press, Boca Raton, FL). Acridin konjugiert am 3'- oder 5'-Ende von Phosphodiester-Oligonucleotiden zeigte neben einer verbesserten Nukleasestabilität und einer festeren Hybridisierung durch Interkalation besonders günstige Permeationseffekte bei verschiedenen Zelltypen (Stein et al., Gene 72 (1988), 333). Ein weiterer interessanter Ansatz zur Fixierung der Oligonucleotide auf der Zelloberfläche wird momentan von mehreren Arbeitsgruppen verfolgt. Die Entdeckung der Ca^{2+} -abhängigen Kohlenhydrat-erkennenden Domänen (CRDs) in den Rezeptoren von Makrophagen öffnete den Weg für eine zellspezifische Strategie. Die Rezeptoren erkennen jedoch nur Strukturen mit mehreren Zuckereinheiten. Für Mannoserezeptoren wurden beispielsweise Antisense-Oligonucleotide mit Mannoseresten über ein hochmolekulares Protein verbunden (Mosigny et al., Adv. Drug. Del. Rev. 14 (1994), 1) oder Mannosephosphoroamidite automatisiert in ODNs eingeführt (Wijsman et al., Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas 115 (1996), 397). Faßt man zusammen, so führte die therapeutische Anwendung von ODNs jedoch bisher insgesamt nur zu unbefriedigenden Ergebnissen, vor allem aufgrund der sehr ineffizienten Aufnahme durch die Zelle und des Fehlens eines spezifischen Transportsystems für bestimmte gewünschte Zellen.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, Antisense-ODNs bereitzustellen, die nicht die Nachteile der vorstehend beschriebenen, bisher therapeutisch eingesetzten Verbindungen aufweisen, d.h. vor allem effizient von der Zelle aufgenommen werden und bevorzugt in gewünschte Zielzellen eingeschleust werden können.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen.

In der vorliegenden Erfindung wurden ODN-Konjugate entwickelt, die über Somatostatin-Rezeptoren (SSTRs) aufgenommen werden können. Somatostatin ist ein im Hypothalamus vorhandenes zy-

klisches Tetradecapeptid, das wichtige regulatorische Funktionen aufweist und hemmende Wirkungen hinsichtlich der Sezernierung von Wachstumshormonen besitzt. Hinzu kommt, daß SSTRs in verschiedenen Tumoren überexprimiert werden, beispielsweise in kleinzelligen Lungentumoren, Brusttumoren, Hirntumoren und vielen weiteren (hauptsächlich endokrinen) Tumoren. Somit stellen die Membran-assoziierten SSTRs ein potentiell molekulares Ziel für die selektive Einschleusung gewünschter Wirkstoffe, insbesondere in Tumoren, dar. Von den Erfindern wurde nun die Überlegung angestellt, daß es möglich sein sollte, in Zellen zu transportierende Stoffe an das natürliche Substrat von SSTRs, d.h. an Somatostatin, zu koppeln und über die SSTRs eine selektive Zellaufnahme zu erreichen. Dem steht allerdings die geringe biologische Halbwertszeit des natürlichen Somatostatins in vivo (weniger als 3 min) entgegen. Es wurden inzwischen aber einige Analoge des Somatostatins entwickelt, die für den erfindungsgemäßen Zweck geeignet sein sollten.

Erfindungsgemäß werden nun Konjugate bereitgestellt, die (a) ein Oligonukleotid (ODN), dessen Sequenz mindestens zu einem Teil einer intrazellulären Nucleinsäuresequenz komplementär ist; und (b) ein Somatostatin-Analoges umfassen. Die erfindungsgemäßen Konjugate erlauben beispielsweise die gezielte Antisense-Therapie vor allem von Tumoren, bei denen SSTRs überexprimiert werden. Neben der Krebstherapie eignen sich die Antisense-Oligonukleotide zur Therapie viraler Erkrankungen, wie HSV-1 (Herpes Simplex Virus)-Erkrankungen, zur Therapie entzündlicher Prozesse (z.B. Ziel RNA: NF- κ B), zur Therapie asthmatischer Erkrankungen (z.B. Ziel-RNA: Adenosin-A1 Rezeptor), zur Therapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (z.B. Ziel-RNA: Dopaminrezeptoren) und zur Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (z.B. Ziel-RNA: c-myc).

Als Oligonukleotide kommen sowohl Oligodesoxyribonucleotide als auch Oligoribonukleotide als Frage, letztere jedoch bevorzugt in stabilisierter Form, z.B. 2-O-Methyl-RNA. Bevorzugt sind wegen ihrer größeren Stabilität jedoch Oligodesoxyribonucleotide.

Als Somatostatin-Analoge werden bevorzugt Octreotid, Octreotat, Tyrosin-3-Octreotid, Tyrosin-3-Octreotat, Lanreotid und RC-160 (C.J. Andersen et al., Chem. Rev. 99, S. 2219-2234 (1999)) verwendet. Desweiteren eignen sich Peptidmimetika, wie PTR 3046 (Gilon et al., J. Med. Chem. 41, S. 919-929 (1998)).

5 Octreotid ist ein sehr wirksames Analoges zu Somastatin, welches ein zyklisches Octapeptid mit einer verbesserten Spezifität und einer Halbwertszeit von etwa 90 min. (Bauer et al., Life Sci. 31 (1982), 1133-1140) ist. Kürzlich zeigte sich, daß

10 Octreotat, das Carbonsäure-Derivat von Octreotid, noch verbesserte pharmakologische Eigenschaften aufweist und somit eine interessante Alternative zu Octreotid darstellt (de Jong et al., Cancer Res. 58 (1998), 437-441). Der hier verwendete Ausdruck "Octreotid" betrifft ein Somatostatin-Analoges mit

15 der von Bauer et al., Life Sci. 31 (1982), 1133-1140, beschriebenen Struktur und der hier verwendete Ausdruck "Octreotat" bezieht sich auf ein Somatostatin-Analoges mit der von de Jong, Cancer Res. 58 (1998), 437-441, beschriebenen Struktur, wobei es sich um ein Carbonsäure-Derivat von Octreotid

20 handelt. Diese Ausdrücke umfassen auch Modifikationen der ursprünglich beschriebenen Moleküle, beispielsweise Modifikationen, die den Austausch, die Deletion oder Addition von einer oder mehreren Aminosäuren betreffen sowie weitere, dem Fachmann bekannte für Peptide übliche Modifikationen, die die

25 Wirksamkeit des Moleküls als Somatostatin-Analoges nicht oder nicht wesentlich beeinträchtigen, z.B. Tyrosin-3-Octreotid und Tyrosin-3-Octreotat. Es eignen sich auch spacermodifizierte Octreotidderivate (Smith-Jones et al., Nucl. Med. Biol. 24, S. 761-769 (1997)).

30 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die Phosphodiesterbindungen des erfindungsgemäßen Oligonucleotid-Moleküls teilweise oder bevorzugterweise vollständig durch Phosphorothioatbindungen ersetzt. Dies hat zur

35 Folge, daß die Oligonucleotid-Moleküle innerhalb der Zelle über eine höhere Halbwertszeit verfügen, da sie vor einem enzymatischen Abbau geschützt sind. Verfahren zur Synthese von solchen modifizierten Oligonucleotid-Molekülen sind dem Fach-

mann bekannt und dazu zählt beispielsweise auch das in dem nachfolgenden Beispiel 3 beschriebene Syntheseverfahren.

5 Zur weiteren Erhöhung der Stabilität des erfindungsgemäßen Oligonucleotid-Moleküls können zusätzliche Modifikationen eingeführt werden. Hier ist beispielsweise der Schutz des 3'-Endes des ODN gegenüber dem Abbau durch Exonucleasen mittels einer Propandiolgruppe zu nennen. Weitere vorteilhafte Modifikationen sind Modifikation der Internucleotid-Phosphodiester-
10 brücke, z.B. Phosphorodithioat, Methylphosphonat; Modifikationen der Zuckerreste, z.B. α -anomere Zucker, 2'-modifizierte Zucker, carbocyclische Zucker; Modifikation der Basen, z.B. 5-Propinyl-T, 7-Desaza-7-propinyl-G (Oligonucleotides and analogues, A practical approach, Editor: F. Eckstein, Oxford University Press 1991; Methods in Molecular Biology, Bd. 26: Protocols for oligonucleotide conjugates: Synthesis and Analytical techniques, Editor: S. Agrawal, Humana Press, 1994).
15 Außerdem sind Peptid-Nucleinsäurederivate (z.B. PNA) brauchbar.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Oligonucleotid-Molekül mit Tyr³-Octreotat, beispielsweise am 5'-Ende oder 3'-Ende, kovalent verknüpft, wobei beispielsweise zur Synthese dieser Verbindung wie in den
25 nachfolgenden Beispielen angegeben vorgegangen werden kann. Dies erlaubt die radioaktive Markierung des Gesamtmoleküls, um so beispielsweise die Effizienz der Bindung an den SSTR und/oder die Aufnahme in die Zelle verfolgen zu können.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform wurde zur Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate von Phosphorothioat-ODNs ausgegangen, die mit Tyr³-Octreotat kovalent verknüpft wurden. Das Peptid wurde über Festphasensynthese synthetisiert, zur Bildung des zyklischen Disulfids oxidiert und anschließend mit
35 einer N-terminalen Maleimido-Einheit derivatisiert. 5'-Thiol-derivatisierte Phosphorothioat-ODNs, die gegen das Protoonco-gen bcl-2 gerichtet waren, wurden an dieses Maleimido-modifizierte Peptid ankonjugiert. Es wurde überraschenderweise ge-

funden, daß mit diesen Tyr³-Octreotid-verknüpften Antisense-Oligonucleotiden die vorstehend genannten Probleme des Standes der Technik gelöst werden können, da es sich zeigte, daß die Konjugate noch an SSTRs mit hoher Affinität binden können, wobei sich weiterhin herausstellte, daß durch die terminale Konjugation der ODNs die Bindung an das Zielnucleinsäureremolekül nicht beeinträchtigt wird.

Besonders bevorzugt sind solche erfindungsgemäßen Oligonucleotid-Konjugate, bei denen das Somatostatin-Analoge, z.B. Octreotid bzw. Octreotat mit dem 5'-Ende des Oligonucleotid-Moleküls kovalent verknüpft ist, beispielsweise über eine Thioether-Verknüpfung oder Verknüpfung über Acetal, Alkin, Amid, Amin, Carbat, α -Carbonyl-Thioether, Disulfid, Ester, Ether, Phosphorsäureester, Sulfonsäureester oder Thioharnstoff. Am meisten bevorzugt ist die Verknüpfung mit dem 5'-Ende des Oligonucleotids über eine Disulfidverknüpfung.

Weiter bevorzugt ist es, daß das Somatostatin-Analoge über einen Spacer mit einem Substituenten einer im Ologonukloetid vorhandenen Base verknüpft ist. Als Spacer eignen sich bevorzugt Kohlenwasserstoffgruppen, z.B. $-(CH_2)_{1-10}-$, ganz bevorzugt Methyl-, Ethyl-, Propylgruppen.

Die Nucleinsäuresequenz des Oligonucleotid-Moleküls wird entsprechend der gewünschten Zielsequenz gestaltet, d.h. sie muß zu dieser im wesentlichen komplementär sein, so daß eine Hybridisierung stattfinden und dadurch die biologische Funktion des intrazellulären Zielmoleküls gehemmt werden kann. Vorzugsweise handelt es sich bei der intrazellulären Nucleinsäuresequenz um eine mRNA, beispielsweise ein Prooncogen bzw. Oncogen codierende mRNA, oder virale RNA, beispielsweise von HIV. Am meisten bevorzugt sind Oligonucleotid-Moleküle, deren Nucleinsäuresequenzen zu dem codierenden Anteil einer mRNA komplementär sind.

Um einerseits eine gute Aufnahme über die SSTRs zu gewähr-

leisten, andererseits eine stabile und spezifische Anlagerung an die Zielnucleinsäuresequenz zu erlauben, sollte die Nucleinsäuresequenz des erfindungsgemäßen Oligonucleotid-Moleküls eine Länge zwischen acht und fünfzig Nucleotiden, stärker bevorzugt eine Länge zwischen zwölf und zwanzig Nucleotiden und am meisten bevorzugt etwa 15 Nucleotide aufweisen.

Wie bereits vorstehend diskutiert, eignen sich die erfindungsgemäßen Oligonucleotid-Moleküle besonders zur Manipulation von Zellen, bei denen die SSTRs überexprimiert sind, beispielsweise bei bestimmten Tumoren, und somit auch zur gezielten Tumorthherapie. Somit betrifft eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Oligonucleotid-Konjugate solche, deren Nucleinsäuresequenz zu der Nucleinsäuresequenz eines Zielmoleküls komplementär ist, dessen Gegenwart innerhalb der Zelle oder dessen Überexpression mit der Erkrankung, z.B. einem Tumor, assoziiert sind. Zu solchen Zielmolekülen zählen beispielsweise die mRNAs von Oncogenen bzw. Protooncogenen, wie bcl-2, p53, N-myc, NF-KB, c-myc, Ha-ras, BCR-ALB, PKA(RI α) und c-raf-1.

Die Hemmung von bcl-2 ist bevorzugt, da eine große Anzahl von Tumortypen eine aberrante Expression des Protooncogens bcl-2 zeigt, was zu einer Erhöhung der Konzentration des Proteins bcl-2 führt. Von diesem Protein weiß man, daß es die Apoptose hemmt. Somit ist die Hemmung der Expression des bcl-2-Gens, um so die Apoptose der Tumorzellen und damit die Eliminierung des Tumors zu bewirken, ein sinnvoller Ansatz zur Krebstherapie. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des Oligonucleotids betrifft daher ein Molekül, dessen Nucleinsäuresequenz zu einem Teil der das Protooncogen bcl-2 codierenden Nucleinsäure komplementär ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Oligonucleotid-Molekül die Nucleinsäuresequenz 5'-GTT CTC CCA GCG TGT GCC AT-3'.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel, das ein erfindungsgemäßes Oligonucleotid-Konjugat enthält, gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeu-

tisch verträglichen Träger. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann in Form einer Injektionslösung, Tablette, Salbe, Suspension, Emulsion, eines Zäpfchens etc. vorliegen. Es kann auch in Form von Depots (Mikrokapseln, Zinksalze, Liposomen etc.) verabreicht werden. Die Art der Verabreichung des Arzneimittels hängt unter anderen davon ab, in welcher Form der Wirkstoff vorliegt, sie kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle (z.B. direkt zu einem Karzinom), intramuskuläre, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale, transdermale oder transmukosale (nasal, vaginal, rektal, sublingual) Verabreichung. Die Verabreichung kann auch durch Mikroinjektion erfolgen. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, der Art und dem Stadium der Erkrankung, der Art der Verabreichung etc..

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Oligonucleotid-Konjugat zur Antisense-Therapie verwendet, beispielsweise zur Behandlung von viralen Erkrankungen, entzündlichen Prozessen, asthmatischen Erkrankungen, Erkrankungen des ZNS, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder zur Krebstherapie, beispielsweise zur Behandlung von kleinzelligen Lungentumoren, Brusttumoren und Hirntumoren.

Beschreibung der Figuren:

Figur 1 : Schema der Herstellung der Tyr³-Octreotat-ODN-Konjugate

Figur 2: Schema der Herstellung des Maleimido-modifizierten Tyr³-Octreotats
 (a) Schrittweise Elongation; (b) TI(TFA)₃; (c) Mal-(CH₂)₅COOH, HOBTU, DIPEA; (d) TFA, H₂O, Phenol, TIS.

Figur 3: Chemische Struktur des Tyr³-Octreotat-ODN-Hybridmoleküls

Figur 4: Chromatogramm einer Umkehrphasen-HPLC
 Konjugation eines Thiol-modifizierten Oligonucleotids mit dem Maleimido-Peptid **4**. (A) Reaktionsgemisch nach vier Stunden; I: verkürzte Sequenzen, II: ODN-Dimer-Nebenprodukt; III: Konjugat; IV: überschüssiges Maleimido-Peptid. (B): Gereinigtes Konjugat **6**

Figur 5: Schmelzkurven von modifizierten und unmodifizierten 20-Mer ODNs in 50 mM Tris/HCl (pH-Wert 7,5), 0,15 M NaCl.

Von komplementären Phosphorodiester-Strängen mit Antisense-bcl-2-Phosphorothioat (O), Sense-bcl-2-Phosphorothioat (•), ODN-Konjugat **5** (□), ODN-Konjugat **6** (■) und Kontroll-Strang-Antisense-bcl-2-Phosphorodiester (♦). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur jeder zehnte Meßpunkt eingezeichnet.

Figur 6: Verdrängung von ¹²⁵I-Tyr³-Octreotid von Rattenkortex-Membranen

Die Messungen wurden aus drei Experimenten ermittelt. Die Ordinate stellt die spezifische Bindung in Prozent dar; diese entspricht der Gesamtbindung minus Bindung in Gegenwart der ODN-Konjugate **5** (□; durchgezogene Linie), **6** (O; gepunktete Linie) und **7** (♦; gestrichelte Linie).

Verwendete Abkürzungen: AcM: Acetamidomethyl; Boc: tert-Butyloxycarbonyl; DIPEA: Diisopropyläthylamin; DTT: Dithiotreitol; Fmoc: 9-Fluorenylmethylmethoxycarbonyl; HOBTU: 2-(1H-benzo-

triazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluroniumhexafluorophosphat;
ODN: Oligodesoxyribonucleotid; SPPS: Festphasen-Peptidsynthese;
SSTR: Somatostatin-Rezeptor; TEAA: Triäthylammoniumacetat; TIS: Triisopropylsilan.

5

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

10

Die Peptide wurden mittels HPLC auf einem "Gynotech P-580"-System (Gynotech, Germering, Deutschland) analysiert und aufgetrennt, das mit einem variablen "SPD 6-A UV detector" und einem "C-R5A integrator" (beide Geräte von Shimadzu, Duisburg, Deutschland) ausgestattet war. Die verwendeten Säulen waren "Nucleosil C₁₈" 5 µm, 250 x 4 mm (Machery & Nagel, Düren, Deutschland) und "Licosorb RP-select B" 10 µm, 250 x 10 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die ODNs wurden auf einem "Waters" HPLC-System auf "PRP-1 Materila" 7 µm, 305 x 7 mm (Hamilton, Bondauz, Schweiz) gereinigt. Die UV-Messungen sowie die Schmelzpunktstudien wurden mit einem Computer mit einem über ein Interface angeschlossenes "Varian Cary 13"-Spektrometer für UV-Licht durchgeführt (Fa. Varian, Palo Alto, USA). Massenspektrometrische Analysen der Peptide und der Oligonucleotide wurden mit einem "Maldi-1" (= Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation; Fa. Kratos Instruments, Chestnut Ridge, New York, USA) durchgeführt. ¹H und ¹³C NMR-Spektren von Maleimido-Peptid 4 wurden auf einem "AM 250"-Spektrometer (Fa. Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten, Deutschland) aufgezeichnet und werden als δ-Einheiten relativ zu CD₃OD (δ = 49,3 für ¹³C) ausgedrückt. Die Peptide wurden manuell in einem SPPS-Reaktor synthetisiert. Die Oligonucleotide wurden auf einem "Model 394"-DNA-Synthesegerät (Applied Biosystems, Foster City, USA) oder auf einem "PerSeptive Expedite 8900"-Synthesegerät (PerSeptive Biosystems, Hamburg, Deutschland) hergestellt. Die Lyophilisierung wurde auf einem "α1-2"-Lyophilisator (Christ, Osterode, Deutschland) durchgeführt. Membranbindungsstudien wurden auf einem eigens dafür hergestellten Filtrationsgerät

15

20

25

30

35

durchgeführt.

Alle Standard-Reagenzien waren von Merck (Darmstadt, Deutschland). Die Chemikalien für die Peptidsynthese waren von Novabiochem (Läufelingen, Schweiz), N-maleiminido-6-capronsäure, Thallium(III)trifluoracetat und TIS von Fluka (Buchs, Schweiz). Die Chemikalien für die Oligonucleotid-Synthese waren von Perkin-Elmer-Applied Biosystems (Norwalk, Connecticut) oder PerSeptive Biosystems (Hamburg, Deutschland). Das Reagenz EDITH für Sulfurisierung war ebenfalls von PerSeptive Biosystems. Das Thiol-Linker-Phosphoramidit war von Glen Research (Sterling, Minnesota, USA). Wasserfreie Lösungsmittel waren von Merck, PerSeptive Biosystems und SDS (Peypin, Frankreich). NAP-10 Gelfiltrationssäulen waren von Pharmacia (Uppsala, Schweden). Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem "Bradford"-Assay (Sigma). Wasser wurde mit einem "Milli-Q"-System von Millipore, Saint-Quentin, Frankreich) gereinigt. Tyr³-Octreotid wurde mittels SPPS hergestellt. ¹²⁵I-Tyr³-Octreotid wurde durch Iodierung von Tyr³-Octreotid mittels des Chloramin-T-Verfahrens gemäß Bakker et al., J. Nucl. Med. 9 (1990), 1501-1509, hergestellt. Das erhaltene Produkt wurde über HPLC gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Das Radioisotop Na¹²⁵I war von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland). Die zueinander komplementären unmodifizierten Phosphodiester-ODNs und Phosphorothioat-ODNs für die Schmelztemperatur-Analyse 5'-GTT CTC CCA GCG TGT GCC AT-3' (Antisense) und 5'-ATG GCA CAC GCT GGG AGA AC-3' (Sense) wurden gemäß Standardverfahren synthetisiert.

Beispiel 2: Synthese des Maleimido-modifizierten Tyr³ - Octreotats

Obwohl Octreotat nur acht Aminosäurereste enthält, wird die Synthese durch verschiedene strukturelle Merkmale erschwert, insbesondere läßt sich die Zyklisierung der Disulfidbrücken nicht mit der für die Konjugation erforderlichen Einführung von Amino- und Thiol-reaktiven Gruppen in Einklang bringen.

Daher wurde in der vorliegenden Erfindung ein Syntheseprotokoll entwickelt, das die Festphasenbildung der Disulfidbrücken und die anschließende Verknüpfung mit der reaktiven Gruppe erlaubt. Dabei wurden die Peptide mittels der Fmoc-Chemie auf 1 g "Fmoc-Thr(^tBu)-Wang"-Harz (0,61 mmol/g) (Fa. Novabiochem, Läufelingen, Schweiz) zusammengefügt (Figur 2). Bei diesem Vorgehen wurde auch der Tyrosin-Rest zur Ermöglichung einer radioaktiven Markierung mit Iod eingeführt. Die Konjugation des Maleimido-Anteils an das Peptid verhinderte die nachfolgende Zyklisierung des Disulfids. N^α-Fmoc-Aminosäuren mit den folgenden Seitenketten-Schutzgruppen wurden verwendet: Cys(Ac-m), Lys(Boc), Thr(^tBu), D-Trp(Boc) und Tyr(^tBu). Alle Kuppelungsschritte wurden in DMF durchgeführt. Die Peptidketten wurden manuell entsprechend einem modifizierten in situ-Neutralisierungszyklus (Schnölzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40 (1992), 180-193) konstruiert. Dieser Zyklus bestand aus einem zweifachen Entkuppeln (1 min und 5 min) mit 50% Piperidin in DMF und 10 min Kuppeln mit 4 Äquivalenten Fmoc-Aminosäure (0,4 M in DMF, 5 min Inkubation mit 3,9 Äquivalenten HOBTU und 6 Äquivalenten DIPEA). Nach Beendigung der Reaktion wurde das Harz (1,75 g Trockengewicht) mit Piperidin in DMF behandelt, um so die Schutzgruppe von der terminalen α-Aminogruppe des Peptids zu entfernen. Ein Aliquot wurde gespalten und über HPLC analysiert, wobei sich die Bildung des Produkts **1** mit einer Ausbeute über 90% zeigte. 200 mg des Harz-gebundenen Peptids **1** wurden mit einem zweifachen molaren Überschuß an Thallium(III)trifluoracetat in DMF bei Raumtemperatur zyklisiert. Durch Analyse eines kleinen Aliquots konnte gezeigt werden, daß die Bildung des Produkts **2** innerhalb einer Stunde im wesentlichen abgeschlossen war. Nach gründlichem Waschen wurde, wie vorstehend beschrieben, N-Maleiminido-6-Caprinsäure angekuppelt, das Harz gewaschen und über Nacht unter Vakuum getrocknet. Die Spaltung wurde mit 5 ml 37:1:1:1 TFA/H₂O/Phenol/TIS zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Harz wurde abfiltriert und gewaschen. Das Peptid wurde durch die allmähliche Zugabe von tert-Butyl-Methyläther bei 4°C präzipitiert. Die Reinigung erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC auf der "RP-selectB"-Säule mit folgendem Gradienten-

ten: 20% B \rightarrow 50% B in 7,5 min und 50% B \rightarrow 100 % B in 5 min (A=H₂O, B= Acetonitril, beide mit 0,1% TFA); Durchflußgeschwindigkeit: 4 ml/min. Unter diesen Bedingungen eluierte das Peptid nach 10,2 min. Nach der Lyophilisierung wurden 44 mg Produkt **4** als lockeres Pulver erhalten (43,6% Gesamtausbeute). Das gereinigte Peptid wurde mittels Massenspektrometrie charakterisiert. Für C₅₉H₇₅N₁₁O₁₅S₂ [M + H]⁺ m/z wurde 1243,4 kalkuliert; gefundener Wert: 1244,2. ¹³C NMR (CD₃OD) δ = 20,02 (q), 20,58 (q), 22,89 (t), 26,28 (t), 27,14 (t), 27,70 (2 C) (t), 29,24 (t), 31,42 (t), 36,75 (t), 38,4 (t), 39,34 (t), 40,19 (t), 40,65 (t), 46,45 (t), 46,52 (t), 53,86 (d), 54,16 (d), 54,43 (d), 55,18 (d), 56,42 (d), 57,68 (d), 59,68 (d), 60,55 (d), 68,55 (d), 69,09 (d), 110,41 (s), 112,33 (d), 116,23 (2 C), 119,53 (d), 120,05 (d), 122,57 (d), 124,83 (d), 127,74 (d), 128,66 (s), 128,91 (s), 129,34 (2 C) (d), 130,66 (2 C) (d), 131,54 (2 C) (d), 135,32 (2 C) (d), 137,99 (s), 138,56 (s), 157,35 (s), 171,26 (s), 172,11 (s), 172,60 (2 C) (s), 172,74 (s), 173,26 (s), 173,57 (s), 174,20 (s), 174,35 (s), 175,00 (s), 175,36 (s).

Nach der Oxidation verschiebt sich die Absorption der β -Kohlenstoffatome des Cysteins im ¹³C-NMR-Spektrum beträchtlich zu größeren δ -Werten (z.B. von δ = 25,5 zu δ = 38,9 für Glutathion). Somit kann diese chemische Verschiebung zur Bestimmung des Oxidationsstatus der Peptide mit Disulfidbrücken verwendet werden. Die ¹³C-NMR-Signale der beiden C _{β} des Cysteins in Verbindung **4** erschienen bei 46,4 und 46,5 ppm, was die Bildung einer Disulfidbrücke anzeigt.

Beispiel 3: Synthese und Reinigung der 5'-Thiol-ODNs

Die ausschließlich Phosphorothioatbindungen enthaltenden ODNs 5'-GTT CTC CCA GCG TGT GCC AT-3' (Antisense), 5'-ATG GCA CAC GCT GGG AGA AC-3' (Sense) und 5'-TAC CGT GTG CGA CCC TCT TG-3' (Nonsense) wurden mittels der β -Cyanoethyl-Phosphoramidit-Chemie im 1 μ m-Bereich synthetisiert. Die Acetylierung wurde mittels 0,1 M Essigsäureanhydrid/Tetrahydrofuran (THF) und 0,1

M Imidazol/THF durchgeführt. Die Sulfurisierung erfolgte mittels des EDITH-Reagens (3-Ethoxy-1,2,4-dithiazolin-5-on). Das im Handel erhältliche Thiol-Linker-Phosphoramidit mit einem Spacer von sechs Kohlenstoffen (1-O-Dimethoxytrityl-Hexyl-Disulfid-1'-[(2-Cyanoethyl)-(N,N-Diisopropyl)]-Phosphoramidit (Glen Research) wurde an das 5'-Ende gekoppelt. An die letzte Kopplung schloß sich ein Acetonitril-Waschschritt an. Das Harz wurde unter einem Argon-Strom getrocknet und 12 Stunden bei 55°C mit konzentriertem Ammoniak behandelt, der 0,1 M DTT enthielt, wobei gleichzeitig die Entfernung der Schutzgruppen des Thiolschutzes als auch die Spaltung vom Harz erfolgte (Gottschling et al., Bioconjugate Chem. 9 (1998), 831-837). Das Harz wurde durch Filtration entfernt und mit konzentriertem Ammoniak gewaschen. Nach Rotationsverdampfung der erhaltenen Lösung verblieb ein klarer Rückstand, der in sterilem Wasser gelöst wurde. Zur Entfernung von überschüssigem DTT wurde die Lösung über eine "NAP-10"-Gelfiltrationssäule geleitet. Die ODN enthaltenden Fraktionen wurden sofort zur Konjugation mit dem Peptid verwendet.

Beispiel 4: Synthese des Tyr³-Octreotat-Oligodesoxyribonucleotid-Konjugats

Die 5'-Thiol-ODNs wurden zu dem Maleimido-Peptid 4 (fünffacher Überschuß) in wäßriger 0,1 M TEAA, pH-Wert 6,5, gegeben, das 20% DMF enthielt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 M TEAA, pH-Wert 6,5, eingestellt. Das Gemisch wurde vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich diese Zeit gemäß einer analytischen HPLC als für eine vollständige Konjugation ausreichend zeigte. Für die Reinigung der Konjugate über RP-HPLC wurden folgende Puffer verwendet: Puffer A: 5% Acetonitril in 0,1 M Triäthylammoniumacetat, pH-Wert 6,5; Puffer B: 70% Acetonitril in 0,1 M Triäthylammoniumacetat, pH-Wert 6,5; es wurde ein linearer Gradient von 0%-100% B (2 ml/min) über einen Zeitraum von 30 min verwendet. Die nach 22,3 min eluierenden Konjugate wurden gesammelt und lyophilisiert. Die Ausbeuten betrugen zwischen 34 und 42% (basierend auf der Menge

der Ausgangs-5'-Thiol-ODNs). Die Konjugate wurden mittels "MALDI-TOF"-Analyse charakterisiert. **5**: $m/z=7822,9$ $[M + H]^+$ ($C_{258}H_{335}N_{79}O_{120}P_{20}S_{23}$: berechnet 7819,96 g/mol); **6**: $m/z=7936,8$ $[M + H]^+$ ($C_{260}H_{331}N_{95}O_{112}P_{20}S_{23}$: berechnet 7936,07 g/mol); und **7**: $m/z=7822,9$ $[M + H]^+$ ($C_{258}H_{335}N_{79}O_{120}P_{20}S_{23}$: berechnet 7819,96 g/mol). Die Herstellung des Tyr³-Octreotat-Oligodesoxyribonucleotid-Konjugats mit einer stabilen Thioether-Bindung ist außerdem schematisch in Figur 1 gezeigt und die chemische Struktur der einzelnen Tyr³-Octreotat-Oligodesoxyribonucleotid-Konjugate in Figur 3.

Das Chromatogramm des Gemischs der Rohprodukte zeigt vier Peaks bei etwa 16,8, 19,2, 21,1 bzw. 24,8 min, die verkürzten Sequenzen, dem ODN-Dimer-Nebenprodukt, dem Konjugat und überschüssigem Maleimido-Peptid entsprechen (Fig. 4). Aufgrund der beträchtlichen Unterschiede hinsichtlich Größe und Polarität konnten die Konjugate leicht von den Kontaminanten und überschüssigem Edukt **4** abgetrennt werden.

Beispiel 5: Schmelztemperaturanalyse der Hybridisierung

Die Schmelztemperaturanalysen wurden zur Bestimmung des Einflusses des Peptidanteils auf die Hybridisierungseffizienz der Antisense-ODN-Peptidkonjugate an den komplementären Strang verwendet. Es wurde die Dissoziation von Duplices bestimmt, die aus äquimolaren Konzentrationen der ODN-Konjugate und einem unmodifizierten 20-mer ODN-Zielmolekül gebildet worden waren. Die Messungen wurden jeweils dreifach in verschlossenen Quartzküvetten (1 cm Pfadlänge) bei 260 nm durchgeführt. Die Proben wurden als Lösungen der beiden komplementären Oligomere in 1000 μ l Puffer mit 0,5 OD hergestellt. Als Puffer wurde 50 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,5, das 0,15 M NaCl enthielt, verwendet. Die Schmelzkurven wurden bei einem Temperaturgradienten von 30 bis 90°C mit einer Heiz- bzw. Kühlrate von 0,5°C/min gemessen. Vor der Analyse wurde bei allen Proben die Hybridisierung der Oligonucleotide durch fünfminütiges Erhitzen auf 90°C und nachfolgendes langsames Abkühlenlassen auf Raumtemperatur

bewirkt. Die Analyse wurde mittels der "Varian thermal"-Software (Fa. Varian, Plao Alto, USA) durchgeführt. Alle T_m -Werte wurden von der ersten Ableitung der Schmelzkurve berechnet und diese stellen aus verschiedenen Analysen erhaltene Durchschnittswerte (\pm Standardabweichung) dar. Die auf wiederholten Experimenten basierende maximale Unsicherheit bezüglich der T_m -Daten beträgt schätzungsweise $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Der T_m der unmodifizierten 20-Mer Ausgangs-Phosphodiestersequenz betrug $73,1 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Im Vergleich dazu waren T_m -Werte der Konjugate **5** ($65,0 \pm 0,0^\circ\text{C}$) und **6** ($63,8 \pm 0,5^\circ\text{C}$) relativ niedrig. Es ist bekannt, daß der T_m eines Phosphorothioats im Vergleich zu dem entsprechenden Phosphodiester-ODN um etwa $0,5^\circ\text{C}$ /Nukleotid absinkt (Freier, In: Antisense Research and Applications. Herausgeber Crooke, S.T., Lebeu, B., CRC Press Boca Raton, FL (1993), 67-82). Somit waren die T_m -Kurven für solche mit unmodifizierten ODNs erhaltenen typisch. Um dies zu bestätigen wurden unmodifizierte Phosphorothioat-ODNs hergestellt. Die erhaltenen T_m -Werte des Antisense-Strangs ($64,8 \pm 0,5^\circ\text{C}$) und des Sense-Strangs ($66,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$) bestätigten die Richtigkeit der Vorhersage. In Figur 5 werden die T_m -Kurven der Duplices, die die Konjugate **5, 6** und die unmodifizierten Phosphorothioat-ODNs enthielten, und die unmodifizierte Duplex verglichen. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß der Peptid-Anteil am 5'-Terminus des 20-Mer-ODN die Hybridisierungseffizienz nicht beeinträchtigt.

Beispiel 6: SSSTR-Bindungsassays

Zur genauen Ermittlung der kompetitiven Verdrängungsreaktion wurde die Konzentration der Konjugate mittels des millimolaren Absorptionskoeffizienten bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, daß ϵ_m die Summe des ϵ_m des ODN und des ϵ_m des Peptids darstellt: $\epsilon_m = \Sigma((nA \times 15,4 + nC \times 7,3 + nG \times 11,7 + nT \times 8,8) \times 0,9) + (nTrp \times 5,0 + nTyr \times 1,4 + nPhe \times 0,2)$. Unter Verwendung dieser Gleichung wurden folgende ϵ_m -Werte ermittelt: **5** =

180,5; **6** = 212,7; und **7** = 180,5. Für die Bindungsassays wurden Rattenkortex-Membranen bei einer Proteinkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ in Inkubationspuffer (10 mM HEPES, pH-Wert 7,6, mit 5% BSA Fraktion V, MgCl_2 (10 mM) und Bacitracin (20 $\mu\text{g/ml}$)) re-suspendiert. Pro Assay wurden 100 μg Protein verwendet. Die Zellmembranen (200 μl) wurden mit 30 μl Inkubationspuffer mit ansteigenden Konzentrationen des Kompetitors (Konjugate **5-7**) (10^{-5} bis 10^{-10} mol/l) vermischt. Ungefähr 20.000 cpm ^{125}I -Tyr³-Octreotid (etwa 20 pM) in 70 μl Inkubationspuffer wurden zugegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Inkubation durch schnelle Filtration über "GF/B"-Glasfaserfilter (Whatman, Springfield Mill, USA) die mit 1% BSA enthaltendem Puffer angefeuchtet worden waren, beendet. Die Filter wurden mit eiskaltem Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl) gewaschen und die gebundene Radioaktivität wurde mittels eines Gamma-Zählers bestimmt. Die durch Messung der Bindung in Gegenwart von überschüssigem nichtmarkierten Octreotid (10^{-6} mol/l) gemessene unspezifische Bindung betrug etwa 10-20% der Gesamtbindung. Die spezifische Bindung wurde als Gesamtbindung minus unspezifische Bindung definiert. Die Ergebnisse sind als die Werte der aus drei Experimenten ermittelten spezifischen Bindung angegeben.

Figur 6 zeigt die fortschreitende Verdrängung von ^{125}I -Tyr³-Octreotid von Rattenkortex-Membranen. Die drei untersuchten Konjugate banden mit hoher Affinität im unteren Nanomolar-Bereich, die IC₅₀-Werte der Konjugate **5**, **6** und **7** betrugen $1,83 \pm 0,17$ nM, $2,52 \pm 0,43$ nM bzw. $1,88 \pm 0,47$ nM. Die ähnlichen Affinitäten machen deutlich, daß die Sequenz des ODN die Rezeptoraffinität nicht wesentlich beeinflusst.

Patentansprüche

- 5 1. Oligonucleotid-Konjugat umfassend: (a) ein Oligonucleotid, dessen Sequenz mindestens zu einem Teil einer intrazellulären Nucleinsäuresequenz komplementär ist; und (b) ein Somatostatin-Analoges.
- 10 2. Oligonukleotid-Konjugat nach Anspruch 1, wobei das Oligonukleotid ein Oligodesoxyribonucleotid ist.
- 15 3. Oligonucleotid-Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei bei dem Oligonucleotid die Phosphodiesterbindungen teilweise oder vollständig durch Phosphorothioat-Bindungen ersetzt sind.
- 20 4. Oligonucleotid-Konjugat nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei bei dem Oligonucleotid das 3'-Ende mit einer Propandiolgruppe kovalent verknüpft ist.
- 25 5. Oligonucleotid-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Somatostatin-Analoge Octreotid oder Octreotat bzw. ein Derivat davon ist.
- 30 6. Oligonukleotid-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Somatostatin-Analoge mit dem 5'-Ende des Oligonukleotid-Moleküls kovalent verknüpft ist.
- 35 7. Oligonukleotid-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Somatostatin-Analoge über einen Spacer mit einer im Oligonucleotid-Molekül vorhandenen Base kovalent verknüpft ist.
8. Oligonucleotid-Konjugat nach Anspruch 5 oder 6, wobei das Somatostatin-Derivat Tyr³-Octreotat ist.
9. Oligonucleotid-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die intrazelluläre Nucleinsäuresequenz eine mRNA oder virale RNA ist.

10. Oligonucleotid-Konjugat nach Anspruch 9, wobei die intrazelluläre Nucleinsäuresequenz der codierende Anteil einer mRNA ist.

5 11. Oligonucleotid-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das Oligonukleotid eine Länge von 8 bis 50 Nucleotiden aufweist.

10 12. Oligonucleotid-Molekül nach Anspruch 11, wobei das Oligonukleotid eine Länge von 12 bis 20 Nucleotiden aufweist.

13. Oligonucleotid-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Oligonukleotid zu einem Teil der das Protooncogen bcl-2 codierenden Nucleinsäure komplementär ist.

15 14. Oligonucleotid-Konjugat nach Anspruch 13, das die Nucleinsäuresequenz 5'-GTT CTC CCA GCG TGT GCC AT-3' umfaßt.

20 15. Arzneimittel, das Oligonucleotid-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 14 enthaltend, gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

16. Verwendung des nach einem der Ansprüche 1 bis 14 definierten Oligonucleotid-Konjugats zur Antisense-Therapie.

25 17. Verwendung nach Anspruch 16 zur Krebstherapie, zur Therapie von viralen Erkrankungen, zur Therapie entzündlicher Prozesse, zur Therapie asthmatischer Erkrankungen, zur Therapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems und zur Therapie
30 von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Zusammenfassung

Oligonucleotid-Konjugate

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Oligonucleotid-Konjugat umfassend: (a) ein Oligonukleotid, dessen Sequenz mindestens zu einem Teil einer intrazellulären Nucleinsäuresequenz komplementär ist; und (b) ein Somatostatin-Analoges. Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein dieses Oligonucleotid-Konjugat enthaltendes Arzneimittel, vorzugsweise zur Therapie von
- 10 Tumoren, bei denen der Somatostatin-Rezeptor (SSTR) überexprimiert wird.

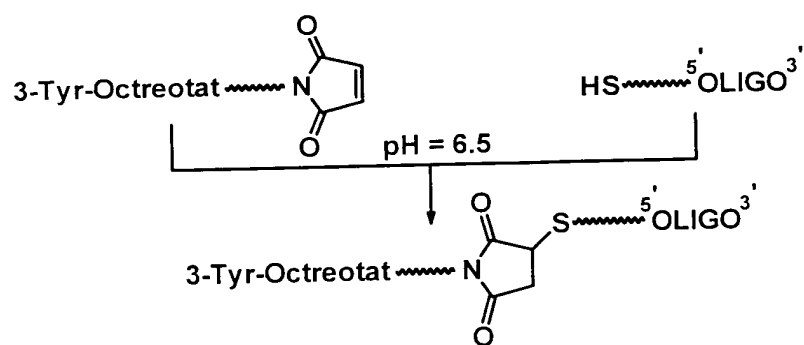
Fig. 1. Synthese der Tyr³-Octreotat-ODN-Konjugate.

Fig. 2. Synthese des Maleinimido-modifizierten Tyr³-Octreotats. Schlüssel: (a) Schrittweise Verlängerung, (b) $\text{Ti}(\text{TFA})_3$, (c) $\text{Mal}-(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$, HOBTU, DIPEA, (d) TFA, H_2O , Phenol, TIS.

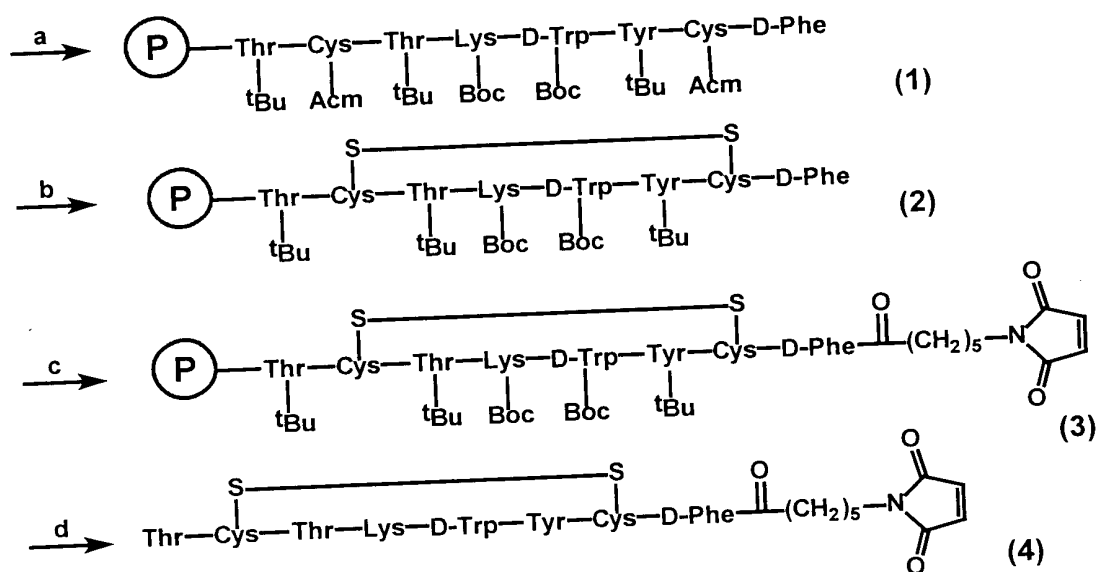
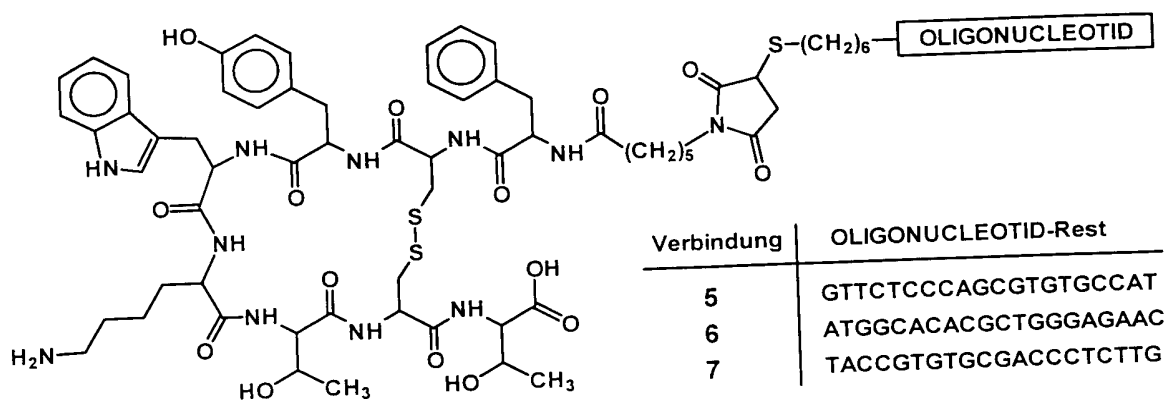


Fig. 3. Chemische Struktur der Tyr³-Octreotat-ODN-Hybrid Moleküle.



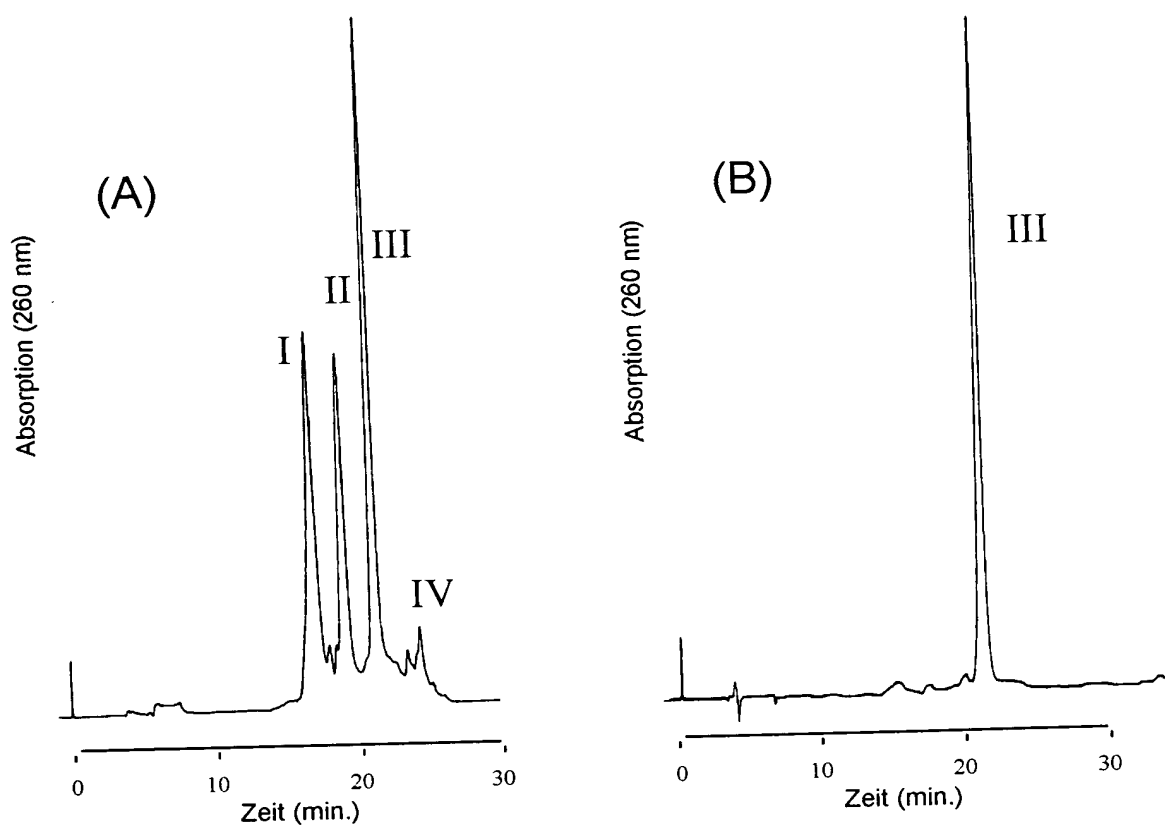


Fig. 4

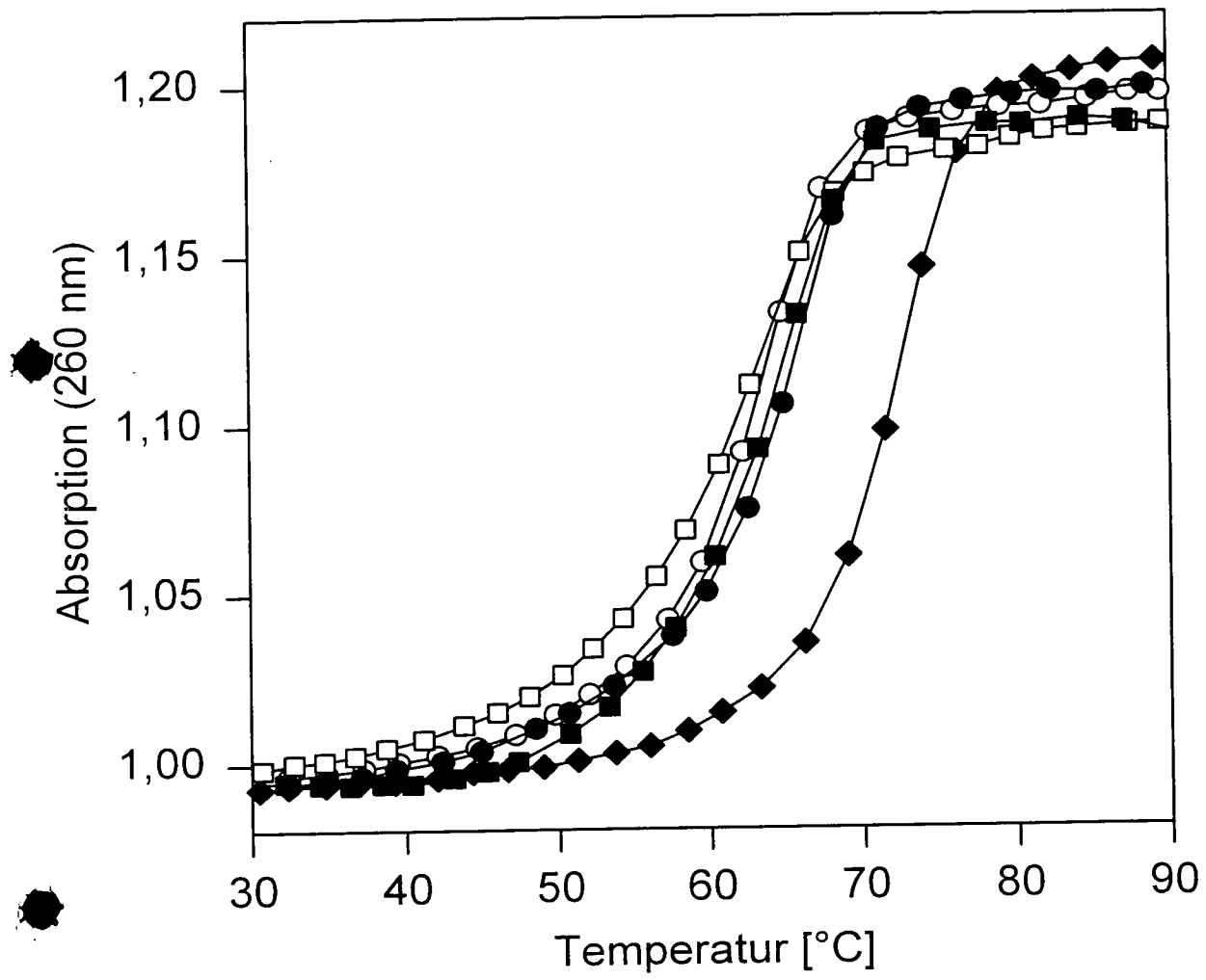


Fig. 5

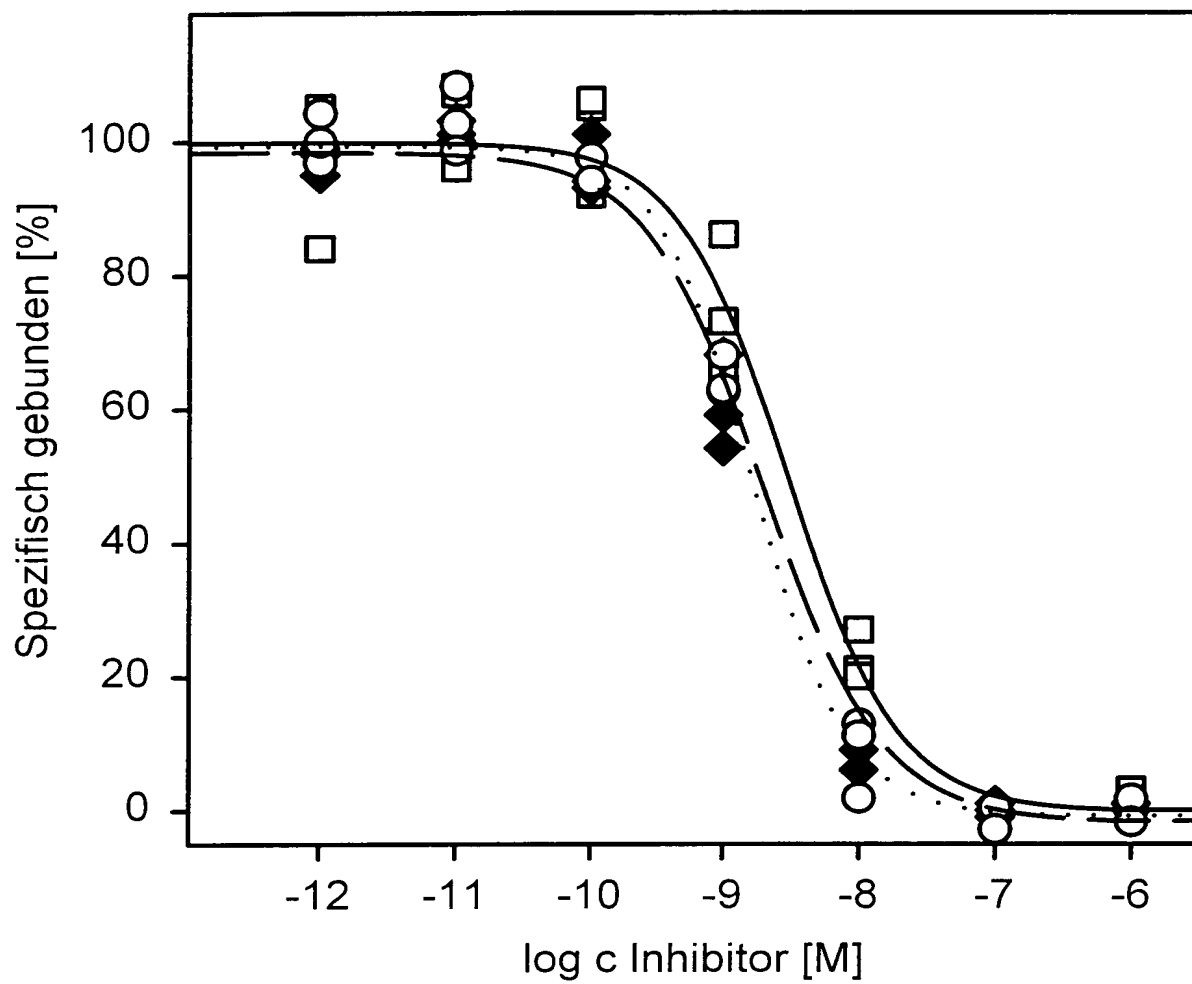


Fig. 6



CERTIFICATE OF VERIFICATION

I, Ursula Scherz of Schlesierstr. 8, 81669 München,
Germany,

state that the attached document is a true and complete
translation to the best of my knowledge of the German
patent application 100 06 572.4.

Dated: March 28, 2001

Signature of Translator:

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Ursula Scherz".

URSULA SCHERZ

Translator for the English
language duly registered,
commissioned and sworn in
by the München I Regional Court

Certified translation of a priority document

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

(coat of arms)

**Certification of Priority on the Filing of a Patent
Application**

File No.: 100 06 572.4

Date of Filing: February 14, 2000

Applicant/Patentee: Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts,
Heidelberg, Neckar/Germany

Title: Oligonucleotide Conjugates

IPC: C 07 K 7/64

The attached sheets are a true and exact reproduction of
the original documents of this patent application.

München, March 15, 2001

German Patent and Trademark Office

The President

Seal:

German Patent and
Trademark Office

by order

(signature)

Waasmeier

Applicant: Deutsches Krebsforschungszentrum
"Oligonucleotide Conjugates"
Attorney's File: K 2734 - sch / st

Oligonucleotide Conjugates

The present invention relates to an oligonucleotide conjugate comprising: (a) an oligonucleotide at least part of whose sequence is complementary to an intracellular nucleic acid sequence; and (b) a somatostatin analog. The present invention also concerns a medicament containing this oligonucleotide conjugate, preferably for treating tissues in which the somatostatin receptor (SSTR) is overexpressed.

A large number of publications was published in recent years (Chrissey, Antisense Res. Devel. 1 (1991), 65), which dealt with the biological activity of synthetic antisense oligonucleotides (ODNs). The concept concealed behind the medical use of such ODNs is the intracellular hybridization with a corresponding sense sequence of the messenger RNA which codes for a certain protein. Following ODN mRNA duplex formation, RNase H is activated which hydrolytically destroys the mRNA. Other mechanisms inhibit the translation initiation and the splicing of pre-mRNA. These mechanisms inhibit the expression of a certain protein and can be repeated for an intact ODN. The effectivity of intracellular antisense ODNs should therefore be high. In addition to a number of promising experiments which were carried out using cell cultures, there were, however, serious retrogressive steps for the clinical application of first-generation antisense ODNs. Second-generation compounds comprised above all the phosphorothioates which distinguished themselves from the ODN derivatives tested by that time by a better *in vivo* stability over nucleases and an increased cell membrane

permeability. The other modifications were carried out with the bases and the oligomeric backbone of the ODNs, which are not dealt with in more detail herein. The partially serious side-effects of the phosphorothioates comprised strong immune responses. The improvements which shall presently be obtained with the commercially favored phosphorothioates are, on the one hand, charge reduction by introducing uncharged oligo building blocks to reduce undesired side-effects and, on the other hand, sequence optimization to improve the affinity for the target mRNA.

It showed that the taking-up of oligonucleotides into the cell depends on the time, temperature, energy and concentration. Physico-chemical characteristics which influence particularly the pharmacokinetics of these compounds are lipophilia, the ionization degree and the molecular structure. In this connection, a limiting effect is in particular their polyanionic charge when passing through the positively charged cell membrane. The membrane transport and the cellular distribution vary strongly in the case of modified oligonucleotides as a function of the modified lipophilia and charge distribution (Crooke and Lebleu, Antisense Research and Applications (1993), CRC Press, Boca Raton, FL). Unmodified phosphodiester oligonucleotides are internalized by receptor-controlled endocytosis in the cell. These 34 to 90 kDa receptor proteins having obviously reduced transport capacity were identified using various methods (Loke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1989), 3474; Yakubov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1989), 6454). However, their real functioning has not yet been deciphered. Methylphosphonates penetrate the cell by absorptive endocytosis (pinocytosis). Other modified oligonucleotides do not rely on a diffusion through the cell membrane either

and are introduced by endocytosis without special receptors. It is still unclear whether the contents of the endosome are readily released in the cytoplasm in the final analysis. The problem consists in the difficult detection of the oligonucleotides in the very close cell compartments of vacuoles, cytoplasm and cell nucleus by the current measuring methods (Milligan et al., J. Med. Chem. 36 (1993), 1923). Some authors report that only up to 10 % of the oligonucleotides migrate from the extracellular space into the cell interior (Edington, Bio/Technology 10 (1992), 993). Microinjections of natural and modified oligonucleotides having fluorescence labeling showed, however, under the fluorescence microscope a concentration of the sample in the cell nucleus within seconds. The correlations between the observations resulting from fluorescence microscopy and the biological activity of the compounds suggested the theory that the transport through the cell membrane and the release of the oligonucleotides from the vacuoles are counted among the most ineffective steps of the described transport mechanisms.

Many efforts have therefore been made to improve permeation. For example, phosphorothioates have an increased antisense activity in the presence of cationic lipids, however, they have none in the presence of anionic lipids (Colige et al., Biochemistry 32 (1993), 7). Due to their increased lipophilia phosphorothioates have an improved passing capability through the cell membrane as compared to phosphodiesteres. On the other hand, they may trigger the above-mentioned undesired side-effects which because of certain ODN sequences and modifications resulted in a massive cytokine release and subsequent immunostimulation (Krieg et al., Nature 374 (1995), 546; Stein et al., Gene 72 (1988), 333). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides caused

complement activation, clot formation and hypertension in monkeys (Galbraith et al., Antisense Res. Dev. 4 (1994), 201). In addition, these compounds have potential binding properties with respect to proteins, such as growth factors and receptors, resulting in numerous non-antisense effects (Mateucci and Wagner, Nature 384 (1996), 20; Stein and Cheng, Science 261 (1994), 1004; Hertl et al., J. Invest. Derm 104 (1995), 813; Maltese et al., Nucleic Acids Res. 23 (1995), 1146; Chavany et al., Molec. Pharmac. 48 (1995), 738).

Other strategies of improving the cell absorption pursued the induction of known transport mechanisms by linking certain groups. Examples are the conjugation of hydrophobic groups such as cholesterol, phospholipids or of charge-compensating poly(L-lysine) (PLL) chains (Crooke and Lebleu, Antisense Research and Applications (1993), CRC Press, Boca Raton, FL). Acridine conjugated at the 3' or 5' end of phosphodiester oligonucleotides showed along with an improved nuclease stability and a tighter hybridization by intercalation particularly favorable permeation effects with various cell types (Stein et al., Gene 72 (1988), 333). Another interesting approach for fixing the oligonucleotides on the cell surfaces is presently pursued by several study groups. The discovery of the Ca^{2+} -dependent carbohydrate-recognizing domains (CRDs) in the receptors of macrophages prepared the ground for a cell-specific strategy. However, the receptors only detect structures having several sugar units. For mannose residues e.g. antisense oligonucleotides were joined with mannose residues via a high-molecular protein (Mosigny et al., Adv. Drug. Del. Rev. 14 (1994), 1) or mannose phosphoroamidites were introduced into ODNs in automated fashion (Wijsman et al., Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas 115 (1996), 397). In summary, the

therapeutic use of ODNs has only led to, on the whole, unsatisfactory results thus far, above all because of the very inefficient taking-up through the cell and the absence of a specific transport system for certain desired cells.

Thus, it is the object of the present invention to provide antisense ODNs which do not have the drawbacks of the above described compounds used in therapy thus far, i.e. above all can be absorbed efficiently by the cell and can preferably be introduced into the desired target cells.

This technical problem is solved by the embodiments characterized in the claims.

The present invention served for developing ODN conjugates which can be taken up via somatostatin receptors (SSTRs). Somatostatin is a cyclic tetradecapeptide which is present in the hypothalamus, comprises important regulatory functions and has inhibitory effects as regards the secretion of growth hormones. In addition, SSTRs are overexpressed in various tumors, e.g. in small cell lung carcinomas, breast tumors, brain tumors, and many other (predominantly endocrine) tumors. Thus, the membrane-associated SSTRs represent a potential molecular target for the selective incorporation of desired active substances, in particular into tumors. The inventors then considered that it should be possible to link substances to be transported into cells to the natural substrate of SSTRs, i.e. to somatostatin, thus achieving selective cell uptake via SSTRs. However, the short biological half-life of natural somatostatin *in vivo* (less than 3 min.) is opposed thereto. However, some analogs of somatostatin have meanwhile been developed which should be suitable for the purpose according to the invention.

According to the invention conjugates are now provided comprising (a) an oligonucleotide (ODN) at least part of whose sequence is complementary to an intracellular nucleic acid sequence; and (b) a somatostatin analog. The conjugates according to the invention permit e.g. the well-calculated antisense therapy, above all of tumors in which SSTRs are overexpressed. In addition to the cancer therapy, the antisense oligonucleotides are adapted to treat viral diseases, such as HSV-1 (herpes simplex virus) diseases, to treat inflammatory processes (e.g. target RNA: NF-KB), to treat asthmatic diseases (e.g. target RNA: adenosine-A1 receptor), to treat diseases of the central nervous system (e.g. target RNA: dopamine receptors), and to treat cardiovascular diseases (e.g. target RNA: c-myc).

The oligonucleotides in consideration are both oligodeoxyribonucleotides and oligoribonucleotides, however, the latter preferably in stabilized form, e.g. 2-O-methyl-RNA. Yet due to their greater stability oligodeoxyribonucleotides are preferred.

Octreotide, octreotate, tyrosine-3-octreotide, tyrosine-3-octreotate, lanreotide and RC-160 (C.J. Andersen et al., Chem. Rev. 99, pages 2219-2234 (1999)) are preferred as somatostatin analogs. In addition, peptide mimetics such as PTR 3046 (Gilon et al., J. Med. Chem. 41, pages 919-929 (1998)) are suitable. Octreotide is a very effective analog of somatostatin which is a cyclic octapeptide having an improved specificity and a half-life of about 90 min. (Bauer et al., Life Sci. 31 (1982), 1133-1140). It turned out recently that octreotate, the carboxylic acid derivative of octreotide, has even improved pharmacological properties and is thus an interesting alternative for octreotide (de Jong

et al., Cancer Res. 58 (1998), 437-441). The expression "octreotide" used herein relates to a somatostatin analog having the structure described by Bauer et al., Life Sci. 31 (1982), 1133-1140 and the expression "octreotate" used herein refers to a somatostatin analog having the structure described by de Jong, Cancer Res. 58 (1998), 437-441, a carboxylic acid derivative of octreotide being concerned. These expressions also comprise modifications of the originally described molecules, e.g. modifications which relate to the exchange, deletion or addition of one or more amino acids and further modifications which are known to a person skilled in the art and which are common for peptides and do not impair, or do not impair substantially, the effectiveness of the molecule as somatostatin analog, e.g. tyrosine-3-octreotide and tyrosine-3-octreotate. Spacer-modified octreotide derivatives are also suitable (Smith-Jones et al., Nucl. Med. Biol. 24, pages 761-769 (1997)).

In a preferred embodiment of the present invention, the phosphodiester compounds of the oligonucleotide molecule according to the invention are partially or preferably fully replaced by phosphorothioate compounds. As a result, the oligonucleotide molecules have a greater half-life within the cell, since they are protected from enzymatic degradation. Methods of synthesizing such modified oligonucleotide molecules are known to the person skilled in the art and they comprise e.g. also the synthesis method described in Example 3 below.

Additional modifications may be introduced to further increase the stability of the oligonucleotide molecule according to the invention. Here, the protection of the 3' end of the ODN over the degradation by exonucleases using a propanediol group has to be mentioned by way of example.

Further advantageous modifications are modifications of the internucleotide phosphodiester bridge, e.g. phosphorodithioate, methylphosphonate; modifications of the sugar residues, e.g. α -anomeric sugars, 2'-modified sugars, carbocyclic sugars; modifications of the bases, e.g. 5-propinyl-T, 7-desaza-7-propinyl-G (oligonucleotides and analogues, A practical approach, Editor: F. Eckstein, Oxford University Press 1991; Methods in Molecular Biology, Vol. 26: Protocols for oligonucleotide conjugates: Synthesis and Analytical techniques, Editor: S. Agrawal, Humana Press, 1994). Peptide-nucleic acid derivatives (e.g. PNA) are also usable.

In another preferred embodiment of the present invention, the oligonucleotide molecule is covalently linked with Tyr³-octreotate, e.g. at the 5' end or 3' end, and e.g. for the synthesis of this compound the steps may be taken as indicated in the below examples. This permits the radioactive labeling of the whole molecule so as to be able to pursue e.g. the efficiency of the binding to the SSSTR and/or the uptake into the cell.

In a preferred embodiment phosphorothioate ODNs were used as a basis for the production of the conjugates according to the invention, which were covalently linked with Tyr³-octreotate. The peptide was synthesized via solid phase synthesis, oxidized to form the cyclic disulfide and then derivatized with an N-terminal maleimido unit. 5'-thiol-derivatized phosphorothioate ODNs which were directed against the proto-oncogene bcl-2 were attached by conjugation to this maleimido-modified peptide. It was found surprisingly that the above-mentioned prior art problems could be solved with these Tyr³-octreotide-linked antisense oligonucleotides, since it showed that the conjugates can

still bind to SSTRs with high affinity, it also turning out that the terminal conjugation of the ODNs does not impair the binding to the target nucleic acid molecule.

Particularly preferred are oligonucleotide conjugates according to the invention in which the somatostatin analog, e.g. octreotide or octreotate is covalently linked with the 5' end of the oligonucleotide molecule, e.g. via a thioether linkage or linkage via acetal, alkine, amide, amine, carbamate, α -carbonyl thioether, disulfide, ester, ether, phosphoric acid ester, sulfonic acid ester or thiourea. The linkage with the 5' end of the oligonucleotide via a disulfide bridge is most preferred.

It is also preferred to link the somatostatin analog with a substituent of a base present in the oligonucleotide via a spacer. Preferably hydrocarbon groups, e.g. $-(CH_2)_{1-10}-$, most preferably methyl, ethyl, propyl groups, are suitable as spacers.

The nucleic acid sequence of the oligonucleotide molecule is designed in accordance with the desired target sequence, i.e. it must be substantially complementary thereto, so that hybridization can take place and thus the biological function of the intracellular target molecule can be inhibited. The intracellular nucleic acid sequence is preferably an mRNA, e.g. an mRNA coding for a protooncogene or oncogene, or viral RNA, e.g. of HIV. Oligonucleotide molecules whose nucleic acid sequences are complementary to the coding part of an mRNA are most preferred.

In order to ensure good uptake via the SSTRs, on the one hand, and permit a stable and specific attachment to the target nucleic acid sequence, on the other, the nucleic acid

sequence of the oligonucleotide molecule according to the invention shall have a length between eight and fifty nucleotides, more preferably a length between twelve and twenty nucleotides, and most preferably about 15 nucleotides.

As discussed above already, the oligonucleotide molecules according to the invention are particularly suitable for manipulating cells in which the SSTRs are overexpressed, e.g. in certain tumors, and thus also for a well-calculated tumor therapy. Thus, a further preferred embodiment of the oligonucleotide conjugates according to the invention relates to those whose nucleic acid sequence is complementary to the nucleic acid sequence of a target molecule whose presence within the cell or whose overexpression is associated with the disease, e.g. a tumor. These target molecules comprise e.g. the mRNAs of oncogenes or proto-oncogenes, such as bcl-2, p53, N-myc, NF-KB, c-myc, Ha-ras, BCR-ALB, PKA(RI α) and c-raf-1.

The inhibition of bcl-2 is preferred, since a large number of tumor types shows an aberrant expression of the proto-oncogene bcl-2, which results in an increase of the concentration of the protein bcl-2. As is known, this protein inhibits apoptosis. Thus, the inhibition of the expression of the bcl-2 gene so as to effect apoptosis of the tumor cells and thus the elimination of the tumor, is a significant approach for a cancer therapy. Therefore, another preferred embodiment of the oligonucleotide relates to a molecule whose nucleic acid sequence is partially complementary to the nucleic acid coding for the proto-oncogene bcl-2. In a particularly preferred embodiment, the oligonucleotide molecule according to the invention

comprises the nucleic acid sequence 5'-GTT CTC CCA GCG TGT GCC AT-3'.

Finally, the present invention relates to a medicament which contains an oligonucleotide conjugate according to the invention, optionally in combination with a pharmaceutically acceptable carrier. A person skilled in the art is familiar with suitable carriers and the formulation of such medicaments. The suitable carriers comprise e.g. phosphate-buffered common salt solutions, water, emulsions, e.g. oil/water emulsions, wetting agents, sterile solutions, etc. The medicament according to the invention may be present in the form of an injection solution, tablet, ointment, suspension, emulsion, suppository, etc. It may also be administered in the form of depots (microcapsules, zinc salts, liposomes, etc.). The kind of administration of the medicament depends *inter alia* on the form in which the active substance is present, it can be effected orally or parenterally. The methods for the parenteral administration comprise the topical, intra-arterial (e.g. directly into a carcinoma), intramuscular, intramedullary, intrathecal, intraventricular, intravenous, intraperitoneal, transdermal or transmucosal (nasal, vaginal, rectal, sublingual) administration. The administration can also be effected by microinjection. The suitable dosage is determined by the attending physician and depends on various factors, e.g. the age, sex, patient's weight, kind and stage of the disease, kind of administration, etc.

The oligonucleotide conjugate according to the invention is preferably used for antisense therapy, e.g. for treating viral diseases, inflammatory processes, asthmatic diseases, diseases of the CNS, cardio-vascular diseases or for cancer

therapy, e.g. for treating small cell lung tumors, breast tumors and brain tumors.

Description of the figures:

Figure 1: Diagram for the production of the Tyr³ octreotate ODN conjugates

Figure 2: Diagram for the production of the maleimido-modified Tyr³ octreotate
 (a) step-wise elongation; (b) TI(TFA)₃; (c) Mal(CH₂)₅COOH, HOBTU, DIPEA; (d) TFA, H₂O, phenol, TIS.

Figure 3: Chemical structure of the Tyr³ octreotate ODN hybrid molecule

Figure 4: Chromatogramm of reverse phase HPLC
 Conjugation of a thiol-modified oligonucleotide with the maleimido peptide **4**. (A) reaction mixture after four hours; I: shortened sequences, II: ODN dimer by-product; III: conjugate; IV: excess maleimido peptide. (B): purified conjugate **6**

Figure 5: Melting curves of modified and non-modified 20-mer ODNs in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl.
 Of complementary phosphorodiester strands having antisense bcl-2 phosphorothioate (O), sense bcl-2 phosphorothioate (•), ODN conjugate **5** (□), ODN conjugate **6** (■), and control strand antisense bcl-2 phosphorodiester (◆). For a better overview only every tenth measuring point is shown.

Figure 6: Displacement of ^{125}I -Tyr³ octreotide of rat cortex membranes

The measurements were determined from three experiments. The ordinate represents the specific binding in percent. It corresponds to the total binding minus binding in the presence of the ODN conjugates **5** (\square); solid line), **6** (O; dotted line) and **7** (\blacklozenge ; broken line)

Abbreviations used: AcM: acetamidomethyl; Boc: tert.-butyloxycarbonyl; DIPEA: diisopropylethylamine; DTT: dithiotreitol; Fmoc: 9-fluorenylmethyl methoxycarbonyl; HOBTU: 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate; ODN: oligodeoxyribonucleotide; SPPS: solid phase peptide synthesis; SSTR: somatostatin receptor; TEAA: triethylammoniumacetate; TIS: triisopropylsilane.

The following examples explain the invention.

Example 1: General methods

The peptides were analyzed and separated by means of HPLC on a "Gynotech P-580" system (Gynotech, Germering, Germany) which was equipped with a variable "SPD 6-A UV detector" and a "C-R5A integrator" (both devices from Shimadzu, Duisburg, Germany). The columns used were "Nucleosil C₁₈" 5 μm , 250 x 4 mm (Machery & Nagel, Düren, Germany), LiChrosorb RP-select B 5 μm , 250 x 4 mm and "LiChrosorb RP-select B" 10 μm , 250 x 10 mm (Merck, Darmstadt, Germany). The ODNs were purified on a "Waters" HPLC system on "PRP-1 Material" 7 μm , 305 x 7 mm (Hamilton, Bondauz, Switzerland). The UV measurements and the melting point studies were carried out with a "Varian Cary 13" spectrometer for U.V. light connected to an interface using a computer (company Varian, Palo Alto,

U.S.A.). Mass spectrometric analyses of the peptides and the oligonucleotides were carried out with a MALDI instrument ("Maldi-1" (= matrix-supported laser desorption/ionization; company Kratos Instruments, Chestnut Ridge, New York, U.S.A.). ^1H and ^{13}C NMR spectrums of maleimido peptide **4** were recorded on an "AM 250" spectrometer (company Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten, Germany) and are expressed as δ units relative to the CD_3OD ($\delta = 49.3$ for ^{13}C). The peptides were synthesized manually in an SPPS reactor. The oligonucleotides were produced on a "Model 394" DNA synthesis device (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) or on a "PerSeptive Expedite 8900" synthesis device (PerSeptive Biosystems, Hamburg, Germany). Lyophilization was carried out on an "α1-2" lyophilizer (Christ, Osterode, Germany). Membrane-binding studies were carried out on a filtration device produced especially for this purpose.

All standard reagents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The chemicals for the peptide synthesis were bought from Novabiochem (Läufelingen, Switzerland), N-maleinimido-6-capronic acid, thallium(III)trifluoroacetate and TIS from Fluka (Buchs, Switzerland). The chemicals for the oligonucleotide synthesis were provided by Perkin-Elmer-Applied Biosystems (Norwalk, Connecticut) or PerSeptive Biosystems (Hamburg, Germany). The reagent EDITH for the sulfurization was also supplied by PerSeptive Biosystems. The thiol linker phosphoroamidite was obtained from Glen Research (Sterling, Minnesota, U.S.A.). Anhydrous solvents were bought from Merck, PerSeptive Biosystems and SDS (Peypin, France). NAP-10 gel filtration columns were obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden). The proteins were determined by means of the "Bradford" assay (Sigma). Water was purified by the Milli-Q" system from Millipore, Saint-Quentin, France). Tyr³ octreotide was produced by means of

SPPS. ^{125}I -Tyr³ octreotide was produced by iodizing Tyr³ octreotide using the chloramine-T method according to Bakker et al., J. Nucl. Med. 9 (1990), 1501-1509. The resulting product was purified over HPLC and stored for further use at -80°C. The radioisotope Na¹²⁵I was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany). The complementary unmodified phosphodiester ODNs and phosphorothioate ODNs for the melting temperature analysis 5'-GTT CTC CCA GCG TGT GCC AT-3' (antisense) and 5'-ATG GCA CAC GCT GGG AGA AC-3' (sense) were synthesized according to standard methods.

Example 2: Synthesis of the maleimido-modified Tyr³ octreotate

Although octreotate only contains eight amino acid residues, the synthesis is rendered more difficult by various structural features, in particular cyclization of the disulfide bridges cannot be harmonized with the introduction of amino-reactive and thiol-reactive groups, required for the conjugation. Therefore, a synthesis protocol was developed in the present invention which permits the solid-phase formation of the disulfide bridges and the subsequent linkage with the reactive group. In this connection, the peptides were joined by means of Fmoc chemistry to 1 g "Fmoc-Thr(^tB)-Wang" resin (0.61 mmol/g) (company of Novabiochem, Läufelingen, Switzerland) (figure 2). With this procedure the tyrosine residue was also introduced to enable radioactive labeling with iodine. The conjugation of the maleimido portion to the peptide prevented the subsequent cyclization of the disulfide. N^α-Fmoc amino acids with the following side chain protective groups were used: Cys(Ac-m), Lys(Boc), Thr(^tBu), D-Trp(Boc) and Tyr(^tBu). All coupling steps were carried out in DMF. The peptide chains were constructed manually in accordance with a modified *in situ*

neutralization cycle (Schnölzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40 (1992), 180-193). This cycle consisted of double decoupling (1 min. and 5 min.) with 50 % piperidine in DMF and 10 min. coupling with 4 equivalents Fmoc amino acid (0.4 M in DMF, 5 min. incubation with 3.9 equivalents HOBTU and 6 equivalents DIPEA). After conclusion of the reaction, the resin (1.75 dry weight) was treated with piperidine in DMF so as to remove the protecting group from the terminal α -amino group of the peptide. An aliquot was cleaved and analyzed over HPLC, product **1** forming with a yield of over 90 %. 200 mg of the resin-bound peptide **1** were cyclized with two times the molar excess of thallium(III)trifluoroacetate in DMF at room temperature. It could be shown by analysis of a small aliquot that the formation of product **2** was substantially concluded within one hour. After thorough washing, N-maleinimido-6-capronic acid was coupled, as described above, the resin was washed and dried overnight in a vacuum. The cleavage was carried out with 5 ml 37:1:1:1 TFA/H₂O/phenol/TIS at room temperature for two hours. The resin was filtered off and washed. The peptide was precipitated by gradual addition of tert.-butyl-methylether at 4°C. The purification was made using reverse phase HPLC on the "RP-selectB" column with the following gradient: 20 % B \rightarrow 50 % B in 7.5 min. and 50 % B \rightarrow 100 % B in 5 min. (A = H₂O, B = acetonitrile, both with 0.1 % TFA); flow rate: 4 ml/min. Under these conditions, the peptide eluted after 10.2 min. Following the lyophilization, 44 mg product **4** were obtained as a loose powder (43.6 % total yield). The purified peptide was characterized by means of mass spectrometry. For C₅₉H₇₅N₁₁O₁₅S₂ [M + H]⁺ m/z 1243.4 were calculated; found value: 1244.2. ¹³C NMR (CD₃OD) δ = 20.02 (q), 20.58 (q), 22.89 (t), 26.28 (t), 27.14 (t), 27.70 (2 C) (t), 29.24 (t), 31.42 (t), 36.75 (t), 38.4 (t), 39.34 (t), 40.19 (t), 40.65 (t), 46.45 (t), 46.52 (t), 53.86

(d), 54.16 (d), 54.43 (d), 55.18 (d), 56.42 (d), 57.68 (d), 59.68 (d), 60.55 (d), 68.55 (d), 69.09 (d), 110.41 (s), 112.33 (d), 116.23 (2 C), 119.53 (d), 120.05 (d), 122.57 (d), 124.83 (d), 127.74 (d), 128.66 (s), 128.91 (s), 129.34 (2 C) (d); 130.66 (2 C) (d), 131.54 (2 C) (d), 125.32 (2 C) (d), 137.99 (s), 138.56 (s), 157.35 (s), 171.26 (s), 172.11 (s), 172.60 (2 C) (s), 172.74 (s), 173.26 (s), 173.57 (s), 174.20 (s), 174.35 (s), 175.00 (s), 175.36 (s).

After the oxidation, the absorption of the β -carbon atoms of the cysteine moves considerably to greater δ values in the ^{13}C -NMR spectrum (e.g. from $\delta = 25.5$ to $\delta = 38.9$ for glutathione). Thus, this chemical shift can be used for determining the oxidation status of the peptides with disulfide bridges. The ^{13}C NMR signals of the two C_β of the cysteine in compound **4** appeared at 46.4 and 46.5 ppm, which indicates the formation of a disulfide bridge.

Example 3: Synthesis and purification of the 5' thiol ODNs

The ODNs exclusively containing phosphorothioate compounds 5'-GTT CTC CCA GCG TGT GCC AT-3' (antisense), 5'-ATG GCA CAC GCT GGG AGA AC-3' (sense) and 5'-TAC CGT GTG CGA CCC TCT TG-3' (non-sense) were synthesized by means of the β -cyanoethyl-phosphoroamidite chemistry in the 1 μm range. The acetylation was carried out by means of 0.1 M acetic anhydride/tetrahydrofuran (THF) and 0.1 M imidazole/THF. The sulfurization was made by means of the EDITH reagent (3-ethoxy-1,2,4-dithiazoline-5-one). The commercially available thiol linker phosphoroamidite having a spacer of six carbon atoms (1-O-dimethoxytrityl-hexyl-disulfide-1'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoroamidite (Glen Research) was coupled to the 5' end. An acetonitrile wash step followed the last coupling. The resin was dried in an argon

stream and treated at 55°C with concentrated ammonia for 12 hours, which contained 0.1 M DTT, the removal of the protecting groups of the thiol protection and the separation from the resin also taking place simultaneously (Gottschling et al., Bioconjugate Chem. 9 (1998), 831-837). The resin was removed by filtration and washed with concentrated ammonia. After rotation evaporation of the resulting solution a clear residue was left which was dissolved in sterile water. In order to remove excess DTT, the solution was passed over an "NAP-10" gel filtration column. The ODN-containing fractions were immediately used for conjugation with the peptide.

**Example 4: Synthesis of the Tyr³ octreotate
oligodeoxyribonucleotide conjugate**

The 5'-thiol ODNs were added to the maleimido peptide **4** (five times the excess) in aqueous 0.1 M TEAA, pH 6.5, which contained 20 % DMF. The pH value was adjusted by adding 1 M TEAA, pH 6.5. The mixture was incubated at room temperature for 4 hours, and it turned out that this time was sufficient for a complete conjugation according to an analytical HPLC. For purifying the conjugates over RP-HPLC the following buffers were used: buffer A: 5 % acetonitrile in 0.1 M triethylammonium acetate, pH 6.5; buffer B: 70 % acetonitrile in 0.1 M triethylammonium acetate, pH 6.5; a linear gradient of 0 % - 100 % B (2 ml/min.) was used over a period of 30 min. The conjugates eluting after 22.3 min. were collected and lyophilized. The yields were between 34 and 42 % (based on the amount of the starting 5'-thiol ODNs). The conjugates were characterized by means of "MALDI-TOF" analysis. **5**: $m/z = 7822.9$ $[M + H]^+$ ($C_{258}H_{335}N_{79}O_{120}P_{20}S_{23}$: calculated 7819.96 g/mol); **6**: $m/z = 7936.8$ $[M + H]^+$ ($C_{260}H_{331}N_{95}O_{112}P_{20}S_{23}$: calculated 7936.07 g/mol); and **7**: $m/z = 7822.9$ $[M + H]^+$ $C_{258}H_{335}N_{79}O_{120}P_{20}S_{23}$: calculated 7819.96 g/mol).

The production of the Tyr³-octreotate oligodeoxyribonucleotide conjugate with a stable thioether bond is also shown by way of diagram in figure 1 and the chemical structure of the individual Tyr³ octreotate oligodeoxyribonucleotide conjugates is illustrated in figure 3.

The chromatogram of the mixture of the crude products shows four peaks at about 16.8, 19.2, 21.1 and 24.8 min., which correspond to shortened sequences, the ODN dimer by-product, the conjugate and excess maleimido peptide (figure 4). Due to the considerable differences existing as regards the size and polarity the conjugates could easily be separated from the contaminants and excess educt 4.

Example 5: Melting temperature analysis of the hybridization

The melting temperature analyses were used for determining the influence of the peptide portion on the hybridization efficiency of the antisense ODN peptide conjugates to the complementary strand. The dissociation of duplexes was determined which had been formed from the equimolar concentrations of the ODN conjugates and an unmodified 20-mer ODN target molecule. The measurements were carried out three times in each case in closed quartz cuvettes (1 cm path length) at 260 nm. The samples were produced as solutions of the two complementary oligomers in 1000 µl buffer with 0.5 OD. 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, which contained 0.15 M NaCl, was used as the buffer. The melting curves were measured with a temperature gradient of 30 to 90°C with a heating and/or cooling rate of 0.5°C/min. The hybridization of the oligonucleotides was effected before the analysis in all samples by five minutes of heating to 90°C and subsequent slow cooling to room temperature. The analysis

was carried out by means of the "Varian thermal" software (company Varian, Palo Alto, U.S.A.). All T_m values were calculated from the first derivative of the melting curve and they represent average values obtained from various analyses (\pm standard deviation). The maximum insecurity as to the T_m data, based on repeated experiments, is approximately $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

The T_m of the unmodified 20-mer starting phosphodiester sequence was $73.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Compared therewith T_m values of conjugates **5** ($65.0 \pm 0.0^\circ\text{C}$) and **6** ($63.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$) were relatively low. It is known that the T_m of a phosphorothioate drops by about $0.5^\circ\text{C}/\text{nucleotide}$ as compared to the corresponding phosphodiester ODN (Freier, in: Antisense Research and Applications. Editor: Crooke, S.T., Lebeu, B., CRC Press Boca Raton, FL (1993), 67-82). Thus, the T_m curves were typical of those obtained with unmodified ODNs. In order to confirm this, unmodified phosphorothioate ODNs were produced. The resulting T_m values of the antisense strand ($64.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$) and the sense strand ($66.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$) confirmed the correctness of the prediction. In figure 5, the T_m curves of the duplexes which contained conjugates **5**, **6** and the unmodified phosphorothioate ODNs, were compared with the unmodified duplex. These results refer to the fact that the peptide portion at the 5' terminus of the 20-mer ODN does not impair the hybridization efficiency.

Example 6: SSTR binding assays

For accurately determining the competitive displacement reaction, the concentration of the conjugates was determined by means of the millimolar absorption coefficient. In this connection, it was assumed that ϵ_m is the sum of ODN ϵ_m and peptide ϵ_m : $\epsilon_m = \sum ((n_A \times 15.4 + n_C \times 7.3 + n_G \times 11.7 + n_T \times$

$8.8) \times 0.9) + (n\text{Trp} \times 5.0 + n\text{Tyr} \times 1.4 + n\text{Phe} \times 0.2)$. Using this equation the following ϵ_m values were determined: **5** = 180.5; **6** = 212.7; and **7** = 180.5. For the binding assays rat cortex membranes were resuspended at a protein concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$ in incubation buffer (10 mM HEPES, pH 7.6 with 5 % BSA fraction V, MgCl_2 (10 mM) and bacitracin (20 $\mu\text{g/ml}$)). 100 μg protein were used per assay. The cell membranes (200 μl) were mixed with 30 μl incubation buffer with increasing concentrations of the competitor (conjugates **5-7**) (10^{-5} to 10^{-10} mol/l). About 20,000 cpm ^{125}I -Tyr³ octreotide (about 20 pM) in 70 μl incubation buffer were added. After one hour at room temperature, the incubation was terminated by rapid filtration over "GF/B" glass fiber filters (Whatman, Springfield Mill, U.S.A.) which had been moistened with 1 % BSA-containing buffer. The filters were washed with ice-cold buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl) and the bound radioactivity was determined by means of a gamma counter. The non-specific binding measured by measuring the binding in the presence of excess non-labeled octreotide (10^{-6} mol/l) was about 10 - 20 % of the total binding. The specific binding was defined as total binding minus non-specific binding. The results are indicated as values of the specific binding determined from three experiments.

Figure 6 shows the progressive displacement of ^{125}I -Tyr³ octreotide of rat cortex membranes. The three examined conjugates bonded with high affinity in the lower nanomolar range, the IC₅₀ values of conjugates **5**, **6** and **7** were 1.83 ± 0.17 nM, 2.52 ± 0.43 nM and 1.88 ± 0.47 nM, respectively. The similar affinities clearly show that the sequence of the ODN does not influence markedly the receptor affinity.

Claims

1. An oligonucleotide conjugate comprising: (a) an oligonucleotide at least part of whose sequence is complementary to an intracellular nucleic acid sequence; and (b) a somatostatin analog.
2. The oligonucleotide conjugate according to claim 1, wherein the oligonucleotide is an oligodeoxyribonucleotide.
3. The oligonucleotide conjugate according to claim 1 or 2, wherein the phosphodiester compounds in the oligonucleotide are partially or fully replaced by phosphorothioate compounds.
4. The oligonucleotide conjugate according to claim 1, 2 or 3, wherein the 3' end in the oligonucleotide is covalently bonded to a propanediol group.
5. The oligonucleotide conjugate according to any one of claims 1 to 4, wherein the somatostatin analog is octreotide or octreotate or a derivative thereof.
6. The oligonucleotide conjugate according to any one of claims 1 to 5, wherein the somatostatin analog is covalently bonded to the 5' end of the oligonucleotide molecule.
7. The oligonucleotide conjugate according to any one of claims 1 to 6, wherein the somatostatin analog is covalently bonded to a base present in the oligonucleotide molecule via a spacer.

8. The oligonucleotide conjugate according to claim 5 or 6, wherein the somatostatin derivative is Tyr³ octreotate.
9. The oligonucleotide conjugate according to any one of claims 1 to 8, wherein the intracellular nucleic acid sequence is an mRNA or viral RNA.
10. The oligonucleotide conjugate according to claim 9, wherein the intracellular nucleic acid sequence is the coding portion of an mRNA.
11. The oligonucleotide conjugate according to any one of claims 1 to 10, wherein the oligonucleotide has a length of 8 to 50 nucleotides.
12. The oligonucleotide molecule according to claim 11, wherein the oligonucleotide has a length of 12 to 20 nucleotides.
13. The oligonucleotide conjugate according to any one of claims 1 to 12, wherein the oligonucleotide is partially complementary to the nucleic acid coding for the proto-oncogene bcl-2.
14. The oligonucleotide conjugate according to claim 13, which comprises the nucleic acid sequence 5'-GTT CTC CCA GCG TGT GCC AT-3'.
15. A pharmaceutical preparation, containing the oligonucleotide conjugate according to any one of claims 1 to 14, optionally in combination with a pharmaceutically compatible carrier.

16. Use of the oligonucleotide conjugate defined according to any one of claims 1 to 14, for the antisense therapy.
17. Use according to claim 16 for cancer treatment, for treating viral diseases, for treating inflammatory processes, for treating asthmatic diseases, for the therapy of diseases of the central nervous system and for the therapy of cardiovascular diseases.

Abstract of the Disclosure**Oligonucleotide Conjugates**

The present invention relates to an oligonucleotide conjugate, comprising: (a) an oligonucleotide at least part of whose sequence is complementary to an intracellular nucleic acid sequence; and (b) a somatostatin analog. The present invention also relates to a medicament containing this oligonucleotide conjugate, preferably for treating tumors in which the somatostatin receptor (SSTR) is overexpressed.

Figure 1: Synthesis of the Tyr³ octreotate ODN conjugates

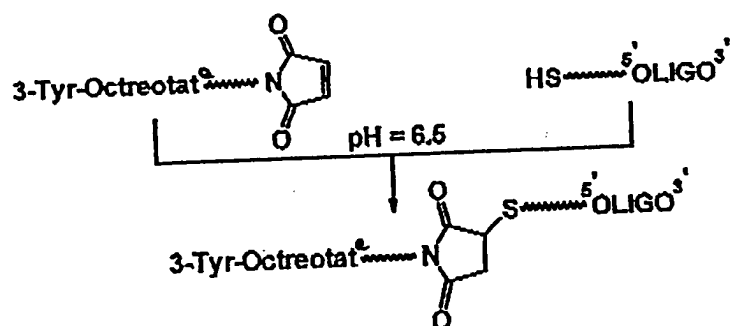


Figure 2: Synthesis of the maleinimido-modified Tyr³ octreotate. Key: (a) step-wise extension, (b) Tl(TFA)₃, (c) Mal-(CH₂)₅COOH, HOBTU, DIPEA, (d) TFA, H₂O, phenol, TIS.

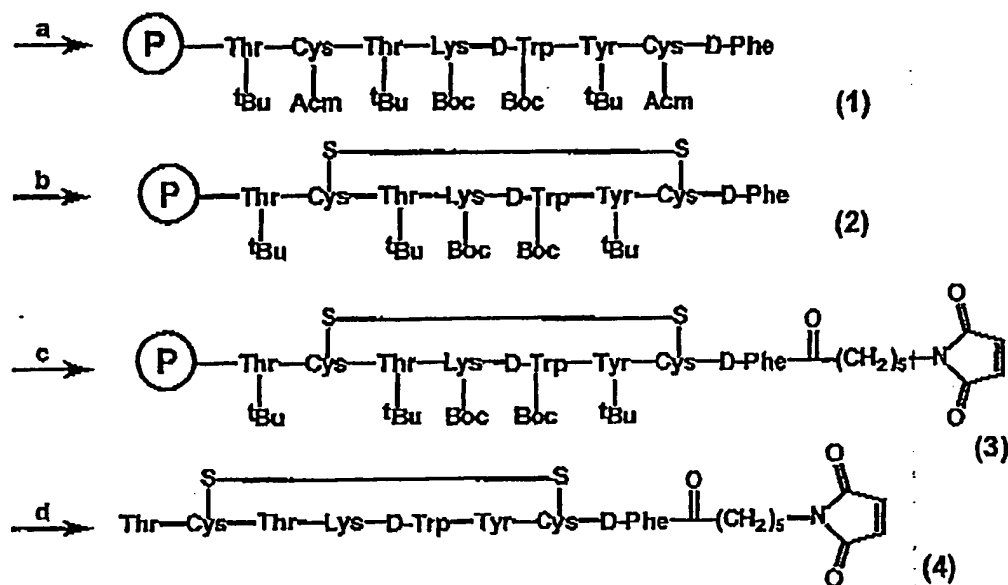
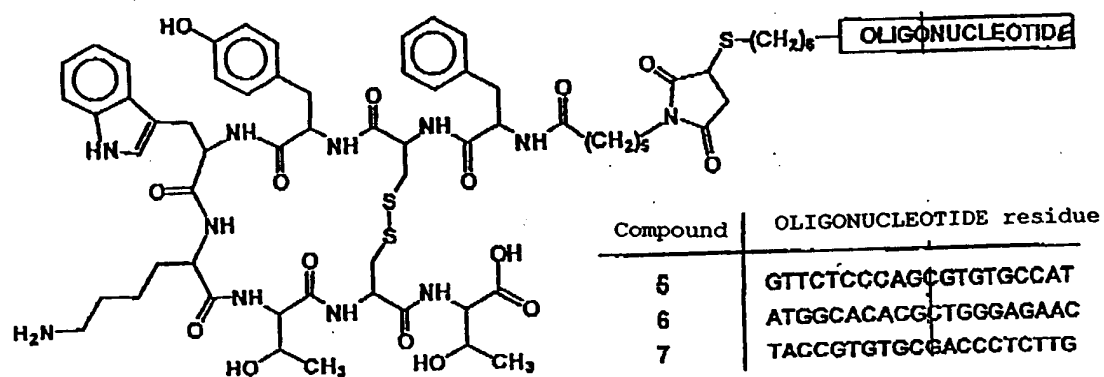


Figure 3: Chemical structure of the Tyr³ octreotate ODN hybrid molecules



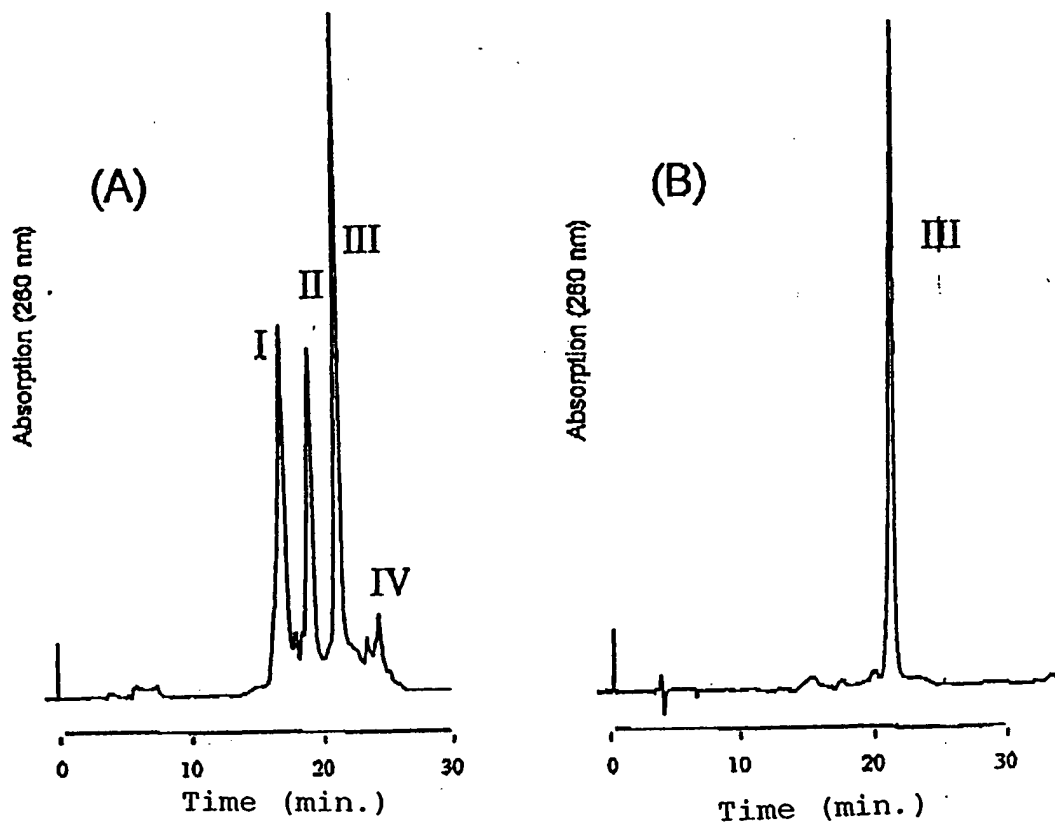


Fig. 4

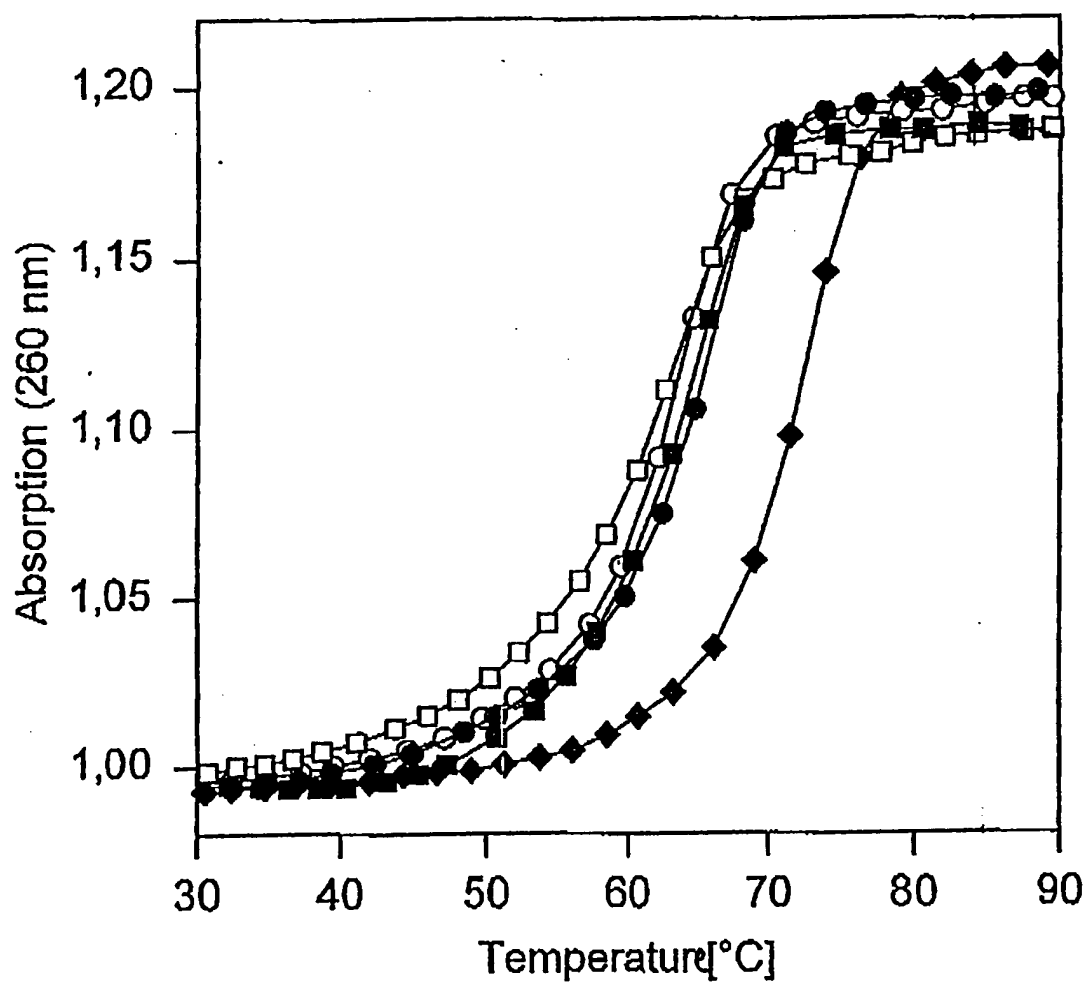


Fig. 5

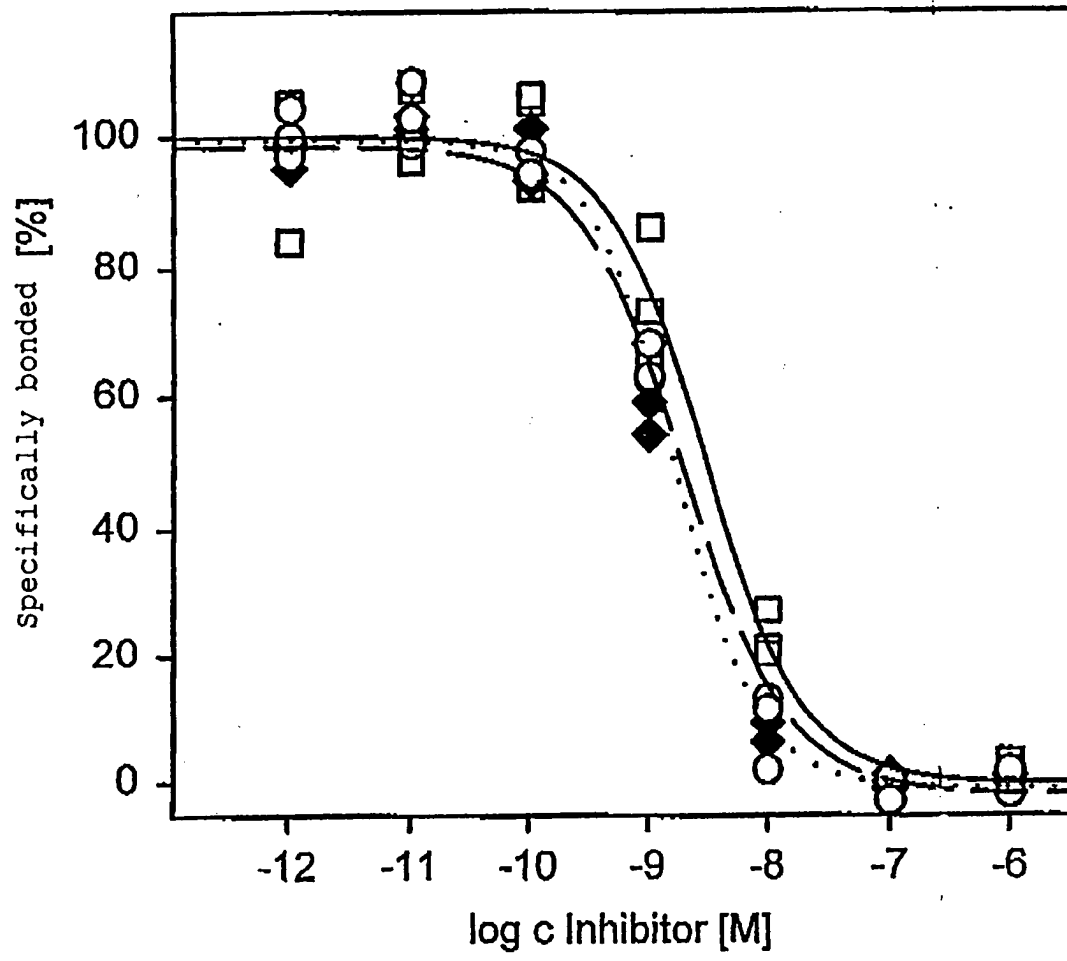


Fig. 6